UNTERSUCHUNGEN ZUR MUREINBIOSYNTHESE BEI GAFFKYA HOMARI UND IHRE HEMMUNG DURCH EINIGE ANTIBIOTIKA

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der
Fakultät für Biologie
der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt
von
Heinz Seidel
aus
Kaisheim

München 1979

Untersuchungen zur Mureinbiosynthese bei Gaffkya homari und ihre Hemmung durch einige Antibiotika

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der
Fakultät für Biologie
der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt
von
Heinz Seidel
aus
Kaisheim

München 1979

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

1. Berichterstatter: Dr.W.P.Hammes
2. Berichterstatter: Prof.Dr.O.Kandler

Tag der Einreichung der Arbeit: 28.5.1979
Tag der mündlichen Prüfung: 18.7.1979

Meinen Eltern

in Dankbarkeit gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite:
1.	Einleitung	1
2.	Material und Methoden	7
2.1.	Organismen	7
2.2.	Materialien	8
2.2.1.	Lösungsmittel	8
2.2.2.	Puffer	8
2.2.3.	Aminosäuren	9
2.2.4.	Antibiotika	9
2.2.5.	Sonstiges	18
2.3.	Nährmedien	19
2.4.	Kulturbedingungen und Anzucht	2o
2.5.	Gewinnung von UDP-aktivierten Zellwandvorstufen	21
2.5.1.	Gewinnung von UDP-MurNAc-Dipeptid, -Tripeptid und -Pentapeptid durch Anreicherung im Wandmedium A und B	22
2.5.2.	Herstellung von UDP-MurNAc-Tetrapeptid..	22
2.6.	Herstellung von radioaktiv markiertem D-Alanyl-D-Alanin	23
2.6.1.	Enzymatische Synthese von D-(^{14}C)Alanyl-D-(^{14}C)Alanin	23
2.6.2.	Synthese von D-Alanyl-D-(^{14}C)Alanin	24
2.6.2.1.	Synthese von t-BOC-DAla-N-hydroxysuccinimid	24
2.6.2.2.	Umsetzung von t-BOC-DAla-N-hydroxysuccinimid mit D-(^{14}C)Alanin	25
2.6.3.	Synthese von D-(^{14}C)Alanyl-D-Alanin	26
2.6.3.1.	Synthese von t-BOC-D-(^{14}C)Alanin	29

Seite:

2.6.3.2.	Kopplung von t-BOC-D-Alanin an das Merrifield-Polymer	29
2.6.3.3.	Schrittweise Synthese von t-BOC-D-(^{14}C) Ala-DAla-Polymer	29
2.6.3.4.	Abspaltung des Dipeptides D-(^{14}C)Alanyl-D-Alanin vom Polymer	3o
2.6.4.	Reinigung der radioaktiv markierten Dipeptide	31
2.7.	Herstellung von radioaktiv markierten UDP-MurNAc-Peptiden	31
2.7.1.	Enzymatische Synthese von UDP-MurNAc-Ala-DGlu-(^{14}C)Lys	31
2.7.2.	Enzymatische Synthese von radioaktiv markierten UDP-MurNAc-Pentapeptiden	32
2.7.2.1.	Enzymatische Synthese der UDP-MurNAc-Pentapeptide mit radioaktiven D-Alaninresten	32
2.7.2.2.	Enzymatische Synthese von L-(^{14}C)Lysin markiertem UDP-MurNAc-Pentapeptid	34
2.7.3.	Enzymatische Synthese radioaktiv markierter UDP-MurNAc-Tetrapeptide	35
2.8.	Enzymgewinnung aus Gaffkya homari	35
2.8.1.	Gewinnung des Zellwand-Membran-Enzymkomplexes aus Gaffkya homari	35
2.8.2.	Gewinnung des Membran-Enzymkomplexes aus Gaffkya homari	37
2.9.	Gewinnung der UDP-MurNAc-Tripeptid : DAla-DAla Ligase aus Streptococcus faecalis	38
2.1o.	Proteinbestimmung	38
2.11.	In vivo Mureinsynthese	39
2.11.1.	Messung der Radioaktivität	39
2.11.2.	Standardreaktionsansatz I zur in vitro Mureinsynthese	4o

Seite:

2.11.2.1. Bestimmung der Gesamtmenge an neu synthetisiertem Murein 4o

2.11.2.2. Bestimmung des zllwandgebundenen Mureins 41

2.11.2.3. Bestimmung des löslichen Mureins 41

2.11.2.4. Bestimmung des während der Inkubation abgespaltenen D-(^{14}C)Alanins 41

2.11.2.5. Quantitative Bestimmung der Lipidzwischenprodukte aus dem Standardreaktionsansatz I 41

2.11.3. Standardreaktionsansatz II zur in vitro Mureinsynthese 42

2.11.4. Standardreaktionsansatz III zur Bestimmung des MurNAc-(^{14}C)Peptid-Zellwand-Antibiotikumkomplexes 42

2.11.5. Aktivitätstest des Zellwand-Membran-Enzymkomplexes aus G. homari 43

2.11.6. Bestimmung des Gesamtmureins und der lipidaktivierten Zwischenprodukte synthetisiert mit Hilfe des Membran-Enzymkomplexes aus G. homari 45

2.11.6.1. Bestimmung der Reaktionsprodukte 45

2.11.6.2. Bestimmung der Syntheseraten 45

2.11.7. Berechnung der Inhibitorkonstanten 45

2.12. Papier- und Dünnschichtchromatographie .. 46

2.12.1. Laufmittel 46

2.12.2. Qualitativer Nachweis der Mureinsynthese auf DC-Kieselgel G 6o Fertigplatten (Merck) 47

2.12.3. Quantitative Chromatographie zur Bestimmung der Produktbildung aus UDP-MurNAc-Pentapeptid und UDP-GlcNAc 47

2.12.4. Präparative Papierchromatographie zur Isolierung von nukleotidaktivierten Mureinvorstufen 48

Seite:

2.12.5. Präparative Dünnschichtchromatographie zur Isolierung von radioaktivem D-Alanyl-D-Alanin 48

2.12.6. Präparative Dünnschichtchromatographie zur Trennung von D-(^{14}C)Alanin und t-BOC-D-(^{14}C)Alanin 49

2.13. Sephadex Gelfiltration 5o

2.13.1. Sephadex Gelfiltration zur Abtrennung der UDP-aktivierten Mureinvorstufen von Protein und Salzen 5o

2.13.2. Sephadex-Gelchromatographie von Nisin 51

2.14. DEAE-Cellulose-Chromatographie 51

2.15. Bestimmung der Phospho-MurNAc-Pentapeptid-Translokaseaktivität 52

3. Ergebnisse 53

3.1. Untersuchung der LD- und DD-Carboxypeptidaseaktivität während der Mureinsynthese.. 53

3.1.1. Abbau der Peptiduntereinheit von UDP-MurNAc-Pentapeptid während der *in vitro* Mureinsynthese 53

3.1.2. Kinetik der Mureinsynthese aus UDP-MurNAc-Pentapeptid oder UDP-MurNAc-Tetrapeptid... 55

3.1.2.1. Kinetik der Mureinsynthese aus unterschiedlich radioaktiv markierten UDP-MurNAc-Pentapeptiden oder UDP-MurNAc-Tetrapeptiden.. 56

3.1.2.2. Der Einbau von Tetra- und Tripeptiduntereinheiten in das Murein 59

3.1.2.3. Kinetik des Einbaues von Penta-, Tetra- und Tripeptiduntereinheiten in das Murein 61

3.1.3. Die Abspaltung von D-Alanin aus den verschiedenen Peptiduntereinheiten bei ablaufender und nicht gleichzeitig stattfindender Mureinsynthese 62

Seite:

3,1.3.1. Alaninabspaltung in Abwesenheit von UDP-GlcNAc 63

3.1.3.2. Alaninabspaltung in Anwesenheit von UDP-GlcNAc 64

3.2. Untersuchung der Wirkung von ß-Laktamring-antibiotika auf die Mureinsynthese aus UDP-MurNAc-Pentapeptid oder UDP-MurNAc-Tetrapeptid 66

3.2.1. Untersuchung und Vergleich der Wirkung von Penicillin G und Cephalosporin C auf denEinbau von MurNAc-Pentapeptid in das Murein 68

3.2.1.1. Untersuchung der Hemmwirkung von Penicillin G auf die Synthese von Murein aus UDP-MurNAc-Pentapeptid 68

3.2.1.2. Untersuchung der Hemmwirkung von Cephalosporin C auf die Synthese von Murein aus UDP-MurNAc-Pentapeptid 69

3.2.2. Untersuchung und Vergleich der Wirkung von Penicillin G und Cephalosporin C auf den Einbau von MurNAc-Tetrapeptid in das Murein 7o

3.2.2.1. Untersuchung der Hemmwirkung von Penicillin G auf den Einbau von MurNAc-Tetrapeptid in das Murein 7o

3.2.2.2. Untersuchung der Hemmwirkung von Cephalosporin C auf die Synthese von Murein aus UDP-MurNAc-Tetrapeptid 71

3.3. Die Wirkung der Peptidantibiotika Nisin und Subtilin auf die *in vitro* Mureinsynthese 74

3.3.1. Untersuchung der Wirkung der Antibiotika Nisin und Subtilin auf die Mureinsynthese aus UDP-MurNAc-Ala-DGlu-(^{14}C)Lys-DAla-DAla und UDP-GlcNAc 75

Seite:

3.3.2.	Untersuchung der Wirkung der Antibiotika Nisin und Subtilin auf die Mureinsynthese aus UDP-MurNAc-Ala-DGlu-Lys-DAla-DAla und UDP-(^{14}C)GlcNAc	78
3.3.3.	Komplexbildung von Nisin oder Subtilin mit Zwischenprodukten der Mureinsynthese	84
3.3.3.1.	Abhängigkeit der Komplexbildung von der Antibiotikakonzentration	85
3.3.3.2.	Komplexbildung mit weiteren lipidaktivierten MurNAc-Peptiden	87
3.3.4.	Untersuchung des Hemmeffektes von Nisin und Subtilin auf die *in vitro* Mureinsynthese mit dem Membran-Enzym aus *G. homari*	88
3.3.4.1.	Hemmung der durch die Membran-Enzympräparation aus *G. homari* katalysierten *in vitro* Mureinsynthese durch Nisin	88
3.3.4.2.	Bestimmung der Inhibitorkonzentrationen K_i im Lineweaver-Burk Diagramm	9o
3.3.5.	Untersuchung der Phospho-MurNAc-Pentapeptid-Translokase im Membran-Enzymkomplex aus *G. homari*	92
3.3.5.1.	Proteinabhängigkeit der Phospho-MurNAc-Pentapeptid Translokase	92
3.3.5.2.	Einfluß von Nisin auf die Translokaseaktivität	94
4.	Diskussion	95
5.	Zusammenfassung	1o3
6.	Literaturverzeichnis	1o5

In der vorliegenden Arbeit werden folgende Abkürzungen verwendet:

ADP	Adenosin-5'-Diphosphat
Ala	Alanin
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
DEAE-	Diäthylaminoäthyl-
DC-	Dünnschicht-
DCCI	N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen, Göttingen
DTT	Dithiotreithol
Et_3N	Triäthylamin
G = GlcNAc	N-Acetyl-D-Glucosamin
Glu	Glutaminsäure
Lys	Lysin
M = MurNAc	N-Acetyl-D-Muraminsäure
MG	Molekulargewicht
SDS	Natrium-dodecylsulfat
t-BOC	tertiär Butyloxycarbonyl-
TCA	Trichloressigsäure
TFA	Trifluoressigsäure
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UDP	Uridin-5'-Diphosphat
UMP	Uridin-5'-Monophosphat
XAGLAA	UDP-MurNAc-Pentapeptid

1. Einleitung

Die Fähigkeit der Bakterienzellwand unter den verschiedensten Umweltbedingungen, insbesondere in einem hypotonischen Medium zu leben und zu wachsen, stellte schon früh die Frage nach dem Aufbau der Zellwand, die in hervorragender Weise dafür verantwortlich sein muß. Die Isolierung von Zellwandbruchstücken aus mechanisch zerschlagenen Bakterienzellen (Salton, 1964) zeigte erstmals in den 50iger Jahren dieses Jahrhunderts, daß die Zellwände von Kokken eine sphärische, die von Bakterien eine zylindrische Gestalt haben. Daraus konnte geschlossen werden, daß die Zellwand die Form der Zellen erhält.

Schon bald erkannte man, daß für diese Formerhaltung und für die osmotische Stabilität der Bakterienzelle ein Polymer verantwortlich ist, das nahezu in allen Bakterien zu einem Anteil von 5 bis 90 % vorhanden war. Es fehlt aber in den zellwandlosen Mycoplasmen und in den Archaebakterien.

Im Unterschied zu formerhaltenden Zellwandstrukturen in Pflanzen und Pilzen, die sich aus ß-Zellulose, Hemizellulose, Glucan, Mannan oder Chitin aufbauen, bestehen

diese Verbindungen aus einem Heteropolymer, das Murein oder Peptidoglycan genannt wird. Es setzt sich aus 2 verschiedenen Acetaminozuckern und 4 bis maximal 8 verschiedenen Aminosäuren zusammen und kann als einziges, sehr großes Molekül angesehen werden, das sackförmig die Zelle umgibt. Es konnte gezeigt werden, daß diese einzigartige Mureinstruktur in grampositiven Bakterien einem osmotischen Druck bis zu 3o Atmosphären standhalten kann. Das Netzwerk des Mureins besteht aus Glycansträngen, die sich alternierend aus ß-1,4-verknüpften N-acetylglucosamin- und N-acetylmuraminsäure-Resten zusammensetzen, und die über Oligopeptide quervernetzt sind.

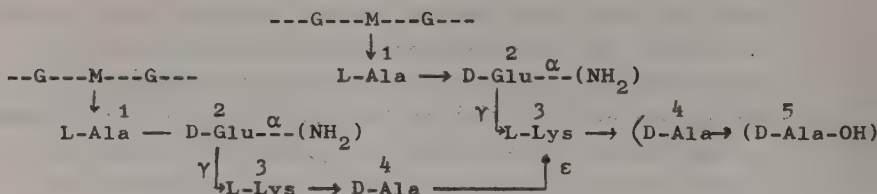


Abb.1:

Ausschnitt aus dem Murein von Gaffkya homari. (Die Indices geben die Position der jeweiligen Aminosäure in der Peptiduntereinheit an. Die eingeklammerten Reste können fehlen.)

Ein Ausschnitt eines sehr einfach aufgebauten Mureins ist in Abb.1 dargestellt. Es kommt in Gaffkya homari vor und zeichnet sich durch eine direkte Quervernetzung aus. Es ist dadurch charakterisiert, daß die Carboxylgruppe des D-Alanins in Position 4 direkt mit der ε-Aminogruppe des Lysins eines benachbarten Stranges verknüpft ist. Dieser einfache Aufbau ist nicht die Regel, sondern es gibt auch

Modifikationen, die allerdings nur die grampositiven Organismen betreffen. In gramnegativen wird stets nur das direkt quervernetzte Murein gefunden mit meso-Diaminopimelinsäure in Position 3. In grampositiven Organismen werden in den Positionen 1 und 3 unterschiedliche Aminosäuren gefunden. Zusätzlich können auch sogenannte Interpeptidketten ausgebildet sein. Das sind 1 bis 6 Aminosäure-Reste, die sich zwischen der ε-Aminogruppe der Diaminosäure in Position 3 und des D-Alaninrestes in Position 4 befinden. Weiterhin besteht eine wesentliche Modifikation in der Ausbildung der Quervernetzung beim sogenannten B-Typ des Mureins (Schleifer und Kandler, 1972). Hier erfolgt die Quervernetzung ausgehend von der α-Carboxylgruppe des D-Glutaminsäure-Restes über eine Diaminosäure zum D-Alanin-Rest in Position 4 einer benachbarten Peptiduntereinheit. Diese Variationsmöglichkeiten werden als taxonomische Hilfsmittel verwendet.

Es ist von Vorteil, wenn ein Enzymsystem benützt werden kann, das aus solchen Bakterien gewonnen wurde, deren Murein möglichst einfach aufgebaut ist; denn die Synthese eines einfach aufgebauten Mureins ist weniger komplex und erlaubt deshalb eine eindeutigere Auswertung der Ergebnisse. Sie verläuft wie in Abb. 2 dargestellt (Anderson et al., 1965, 1967; Ward and Perkins, 1973, 1974).

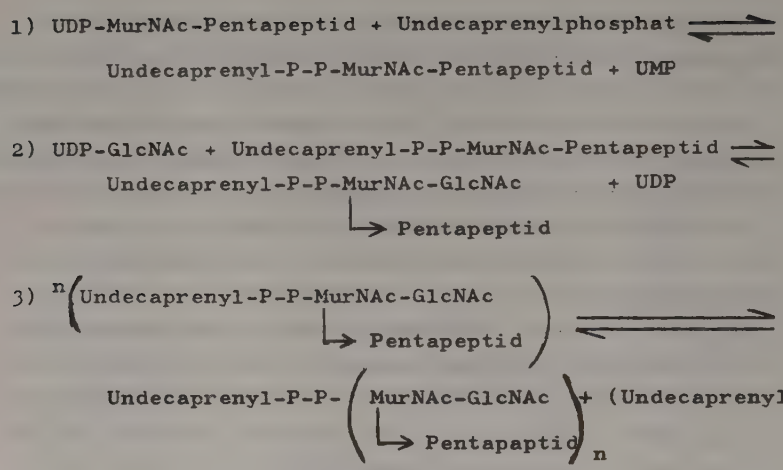


Abb.2:
Mureinsynthese nach Anderson et al.
modifiziert.

Für den letzten Syntheseschritt, den Einbau des neu synthetisierten Glycanstranges in die vorgegebene alte Zellwand, wurde von Hammes und Kandler (1976) ein Mechanismus vorgeschlagen, der sich auf Ergebnisse stützt, die mit G. homari erhalten wurden.

In diesem Modell fungieren die Peptiduntereinheiten der vorgefertigten Peptidoglycanmizelle als Donoruntereinheiten, und die Peptiduntereinheiten des neuen Glycanstranges als Akzeptoruntereinheiten. Dabei wird von der alten Zellwand das endständige D-Alanin in Position 5 unter Erhaltung der Bindungsenergie abgespalten und die frei gewordene Carboxylgruppe des D-Alanins in Position 4 geht eine Peptidbindung mit der freien ε-Aminogruppe des neuen Stranges ein.

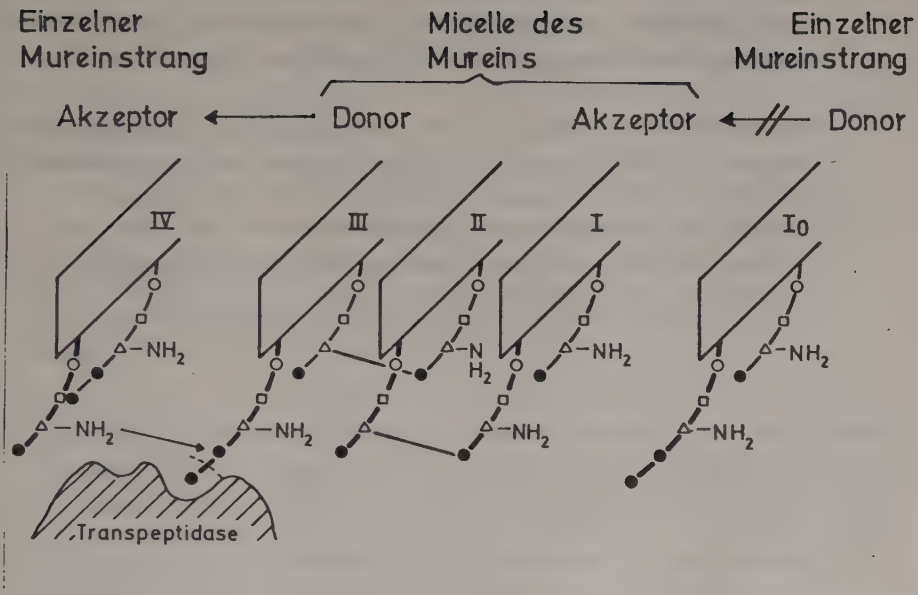


Abb. 3:

Vermuteter Weg des Einbaues eines neu synthetisierten Glycanstranges in das vorgegebene Zellwandmurein via Transpeptidierung. Mureinstrang I, II und III repräsentieren das Zellwandmurein, I_o und IV das neu synthetisierte Murein. Die Aminosäuren der Peptiduntereinheiten sind: (o) L-Alanin, (□) D-Glutaminsäure, (Δ) L-Lysin, (●) D-Alanin.

In Abbildung 3 liegen die Peptiduntereinheiten als Pentapeptide vor. Betrachtet man aber das Murein in situ, das bei G. homari nur zu etwa 4o % (Nakel et al., 1971) quervernetzt ist, so findet man, daß die Peptiduntereinheiten aus Tri-, Tetra- und Pentapeptiden bestehen. Hydrolytische

Enzyme, die die Bildung derart verkürzter Peptidunterein-heiten katalysieren sind als Carboxypeptidasen bekannt. Sie wurden schon vielfach aus grampositiven und gramnegati-ven Bakterien isoliert und ihre Spezifität wurde unter-sucht. (Pelzer, H. 1963; Izaki and Strominger, 1968; Blum-berg and Strominger, 1974; Beck and Park, 1977).

Man kennt ihre Eigenschaften, aber über ihre Notwendigkeit während der Mureinsynthese wurden bisher nur Vermutungen angestellt. Die Lösung dieser noch offenen Fragen war Ziel meiner Untersuchungen. Darüberhinaus war unser An-liegen, die Wirkung verschiedener Antibiotika auf die Synthese dieses Polymers zu bestimmen.

2. Material und Methoden

2.1. Organismen

Die Organismen und ihre Herkunft sind im Folgenden aufgeführt:

Gattung	Species	Herkunft	Stammbezeichnung
Staphylococcus	aureus	Strominger°	Kopenhagen
Streptococcus	faecalis	ATCC*	8043
Micrococcus	luteus	CCM**	169
Gaffkya	homari	ATCC*	10400

Strominger° = Prof.J.L.Strominger, University of Wisconsin Medical School, Madison, USA

ATCC* = American Type Culture Collection, Rockville Maryland, USA

CCM** = Czechoslovak Collection of Microorganisms, Brno, CSSR

2.2. Materialien

2.2.1. Lösungsmittel

1) Wasserfreies Äthanol
   5 g Magnesiumspäne wurden in 5o ml absolutem Äthanol und 1 ml Tetrachlorkohlenstoff 2-3 Stunden am Rückfluß gekocht. 95o ml absoluter Äthanol wurden zugesetzt und weitere 5 Stunden unter Rückfluß gekocht; anschließend wurde destilliert.

2) Wasserfreies Dichlormethan
   Dichlormethan wurde mit K_2CO_3 geschüttelt und anschließend abdestilliert.

3) Peroxidfreies Dioxan
   Dioxan wurde über KOH-Plätzchen destilliert.

Alle Lösungsmittel wurden von der Fa. E.Merck in Darmstadt bezogen.

2.2.2. Puffer

1) Tris-HCl-Puffer A:	Tris-HCl pH 7.8:	5o	mmol/l
	$MgCl_2$:	3o	mmol/l
	DTT :	1o	mmol/l
2) Tris-HCl-Puffer B:	Tris HCl pH 7.8:	2o	mmol/l
	KCl :	1	mol/l
3) Triäthylaminocarbonat-Puffer:	Triäthylanin mit CO_2 gesättigt :	1	mol/l

2.2.3. Aminosäuren

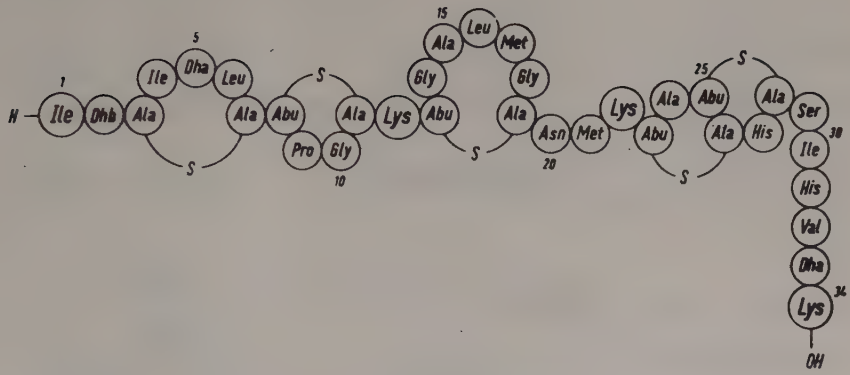
D-(^{14}C)Alanin	Fa.Amersham Buchler
L-(^{14}C)Lysin	Fa.Amersham Buchler
D-Alanin	Fa.E.Merck, Darmstadt
D-Alanyl-D-Alanin	Fa.Bachem fine chemicals California, USA
L-Lysin	Fa.Roth, Karlsruhe
D-Glutaminsäure	Fa.E.Merck, Darmstadt
t-BOC-D-Alanin	Fa.Bachem fine chemicals California, USA
Uracil	Fa.E.Merck, Darmstadt

2.2.4. Antibiotika

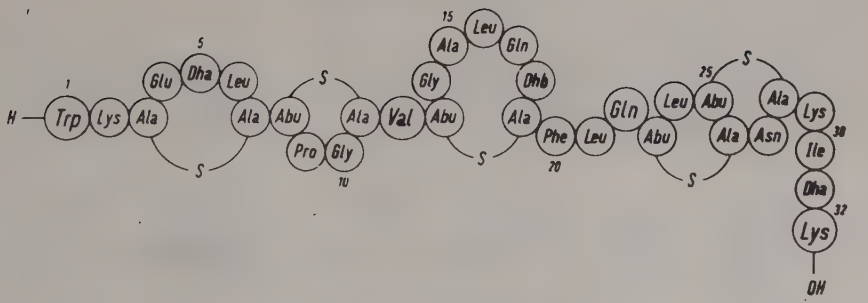
Antibiotika	Molekular-gewicht	Hersteller
1) Nisin	3500	Koch-Light Laboratories
2) Subtilin	3303	ICN Pharmaceuticals
3) Penicillin G Na^+	356.38	Hoechst AG
4) Penicillin V K^+	350.38	Hoechst AG
5) 6-Aminopenicillansäure	214.28	Hoechst AG umkrist. nach Hladny
6) D-Penicillamin	149.21	dto.
7) Methicillin Na^+	402.42	Hoechst AG
8) Propicillin K^+	416.55	Hoechst AG
9) Ampicillin	349.42	Hoechst AG
10) Pivampicillin·HCl	500.01	Hoechst AG
11) Carbenicillin Na^+	400.41	Pfizer
12) Epicillin	351.43	Hoechst AG
13) Azidocillin Na^+	398.41	Hoechst AG
14) Oxacillin $Na^+ \cdot H_2O$	441.43	Hoechst AG
15) Flucloxacillin $Na^+ \cdot H_2O$	493.84	Bachem

Antibiotika	Molekular-gewicht	Hersteller
16) Mecillinam HCl·2H_2O	397.92	Leo Pharmaceuticals
17) Cephalosporin C	415.44	Hoechst A.G.
18) Cefoxitin Na^+	449.44	Merck Sharpe u.Dome
19) Cephalotin Na^+	419.43	Eli Lilly
2o) Cephalexin	347.4o	Hoechst A.G.
21) Cephacetril Na^+	361.31	Ciba-Geigy
22) Cephaloridine	415.5o	Eli Lilly
23) Cefazedon Na^+	568.43	E. Merck, Darmstadt
24) Cephapirin Na^+	445.45	Lappe
25) Cefazolin	454.5o	Lappe
26) Cephradine · H_2O	367.41	Dauelsberg
27) Cephaloglycin	4o5.44	Hoechst A.G.
28) α-Aminopimelinsäure	176.22	ICN Pharmaceuticals
29) Hoe 7462oo	577.66	Hoechst A.G.
3o) Hoe 415oo	374.42	Hoechst A.G.
31) Hoe 31466	394.5o	Hoechst A.G.
32) EMD 29946	555.36	E. Merck, Darmstadt

Formeln der verwendeten Antibiotika:

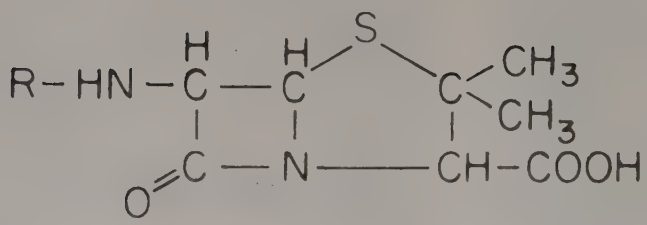


Struktur des Nisins.

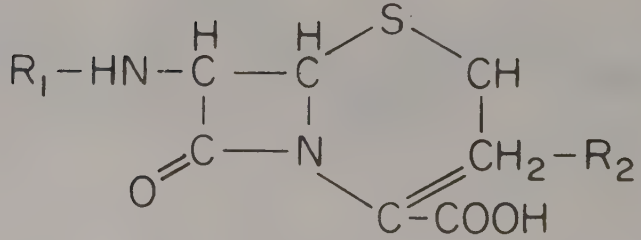


Struktur des Subtilins.

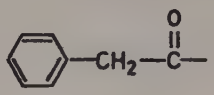
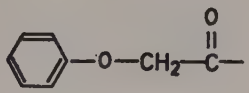
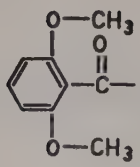
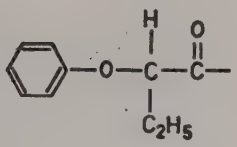
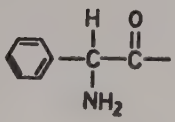
Penicillin



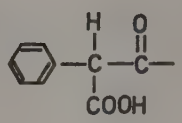
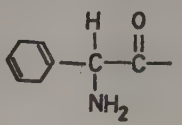
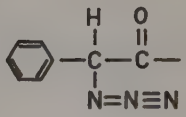
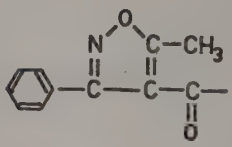
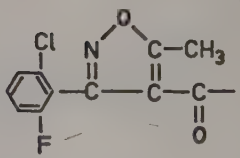
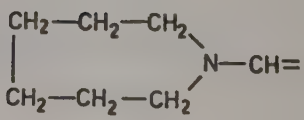
Cephalosporin



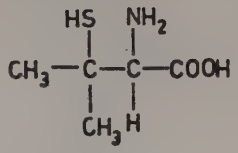
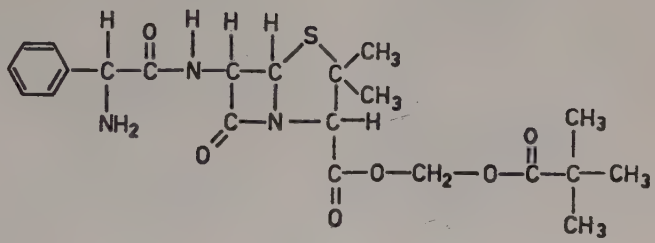
Tab.1: Penam-Antibiotika
(N-Acyl-Derivate der 6-Amino-penicillansäure)

Name	MG	Acyl-Rest R
Penicillin G Na^+	356,38	
Penicillin V K^+	35o.38	
6-Aminopenicillansäure	216,28	
Methicillin Na^+	4o2.42	
Propicillin K^+	416.55	
Ampicillin	349.42	

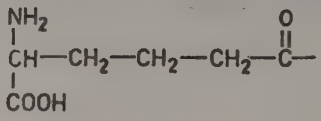
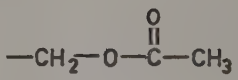
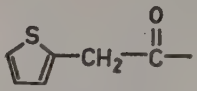
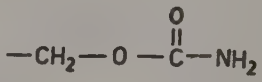
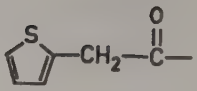
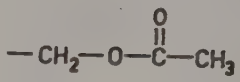
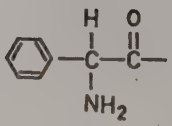
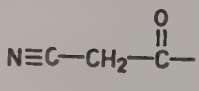
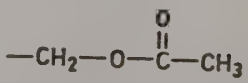
Fortsetzung Tab.1

Carbenicillin	4oo.41	
Epicillin	351.43	
Azidocillin Na^+	398.41	
Oxacillin $Na^+ \cdot H_2O$	441.43	
Flucloxacillin Na^+	493.84	
Mecillinam $\cdot$ HCl $\cdot$ H_2O	397.92	

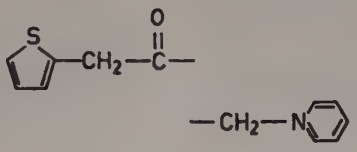
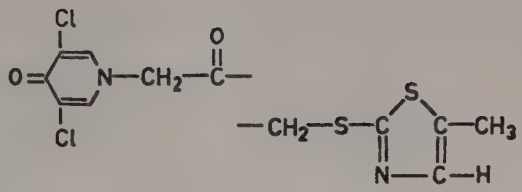
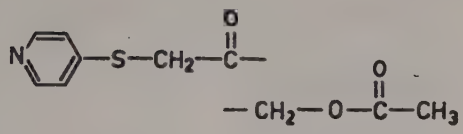
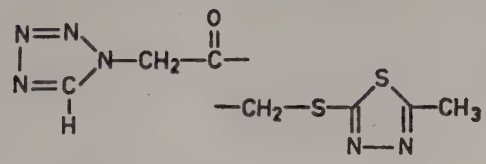
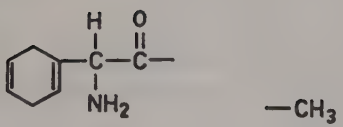
Fortsetzung Tab.1

D-Penicillamin (vollständige Formel)	149.21	
Pivampicillin · HCl (vollständige Formel)	5oo.o1	

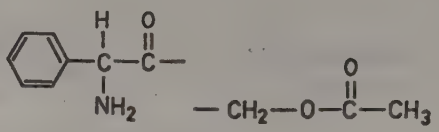
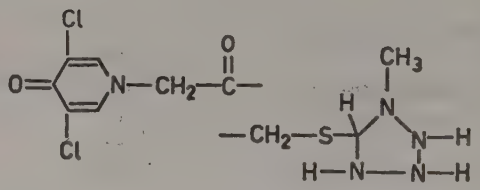
Tab.2: Cephem-Antibiotika
(Derivate der 7-Amino-cephalosporansäure)

Name	R_1	R_2
Cephalosporin C (415.44)		
Cefoxitin (449.44)		
Cefalotin Na^+ (396.44)		
Cephalexin (347.4o)		
Cephacetril · Na^+ (361.31)		

Fortsetzung Tab.2

Cephaloridine (415.5o)	
Cefazedon Na^+ (568.43)	
Cefapirin Na^+ (445.45)	
Cefazolin (454.5o)	
Cephradine · H_2O (367.41)	

Fortsetzung Tab.2

Cephaloglycin (405.44)	
EMD 29946 Na^+ (555.36)	

2.2.5. Sonstiges

1) Medizinischer Röntgenfilm	Bero-X-ray Pr.90
2) HBr-Gas	Baker Chemikals BV Deventer, Holland
3) Silicon-Antischaumemulsion M-30 reinst	Serva Chemie Heidelberg
4) N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid purissimum	Fluka AG, Buchs SG Schweiz
5) 2,3,5-Triphenyl-2H-tetrazolium-chlorid Monohydrat	EGA Chemie, Sternheim BRD
6) Desoxyribonuclease aus E.coli	Boehringer

2.3. Nährmedien

2.3.1. AC-Medium (Heydanek et al. 197o)

Pepton (Difco)	1o g
Hefeextrakt (Difco)	1o g
D-Glucose	1o g
K_2HPO_4	5 g
dest. Wasser	ad 1 l

Die Glucose wurde nach dem Autoklavieren als 2o %ige Lösung steril zugegeben.

2.3.2. Hefe-Dextrose-Agar

Casein Pepton (Merck)	1o g
Hefeextrakt (Merck)	5 g
D-Glucose	5 g
NaCl	8 g
Agar (Oxoid, London)	1o g
dest.Wasser; pH 7,2-7,6	ad 1 l

Die Nährmedien wurden bei 12o°C für 2o min autoklaviert.

2.3.3. Wandmedium A

D-Cycloserin (Gabe der Hoffmann-LaRoche AG)	3o,6 mg
L-Alanin	2oo mg
D-Glutaminsäure	2oo mg
L-Lysin	2oo mg
Uracil	1oo mg
D-Glucose	1o g
K_2HPO_4	5 g
dest. Wasser	ad 1 l

2,3.4. Wandmedium B

Penicillin G	25o mg
DL-Alanin	4oo mg
D-Glutaminsäure	2oo mg
L-Lysin	2oo mg
Uracil	15o mg
D-Glucose	1o g
K_2HPO_4	5 g
dest. Wasser	ad 1 l

2.4. Kulturbedingungen und Anzucht

Die Stammkulturen der Organismen wurden auf Schrägagar im Turnus von 4 Wochen überimpft und bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt. Mikrokokken, Streptokokken und Staphylokokken wurden bei 37°C, Gaffkya homari bei 34°C aerob in AC-Medium kultiviert. Die Einheitlichkeit der Kulturen wurde durch Phasenkontrastmikroskopie und durch Ausplattieren im Verdünnungsausstrichverfahren überprüft. Zur Züchtung von Massenkulturen wurden 1 l Medium (in 5 l Erlenmeyerkolben) mit 5o ml der dicht bewachsenen Übernachtkultur beimpft. Ansätze von 4 x 1 l waren zur Gewinnung der nukleotidaktivierten Mureinvorstufen ausreichend.

Zur Enzymgewinnung aus G. homari und Streptococcus faecalis wurden 16 l AC-Medium mit einer dicht bewachsenen Übernachtkultur so beimpft, daß eine optische Dichte von o,1 erreicht wurde (ca. 2 x 1 l).

Bei Massenkulturen von G. homari wurde auf gute Durchlüftung des Mediums großen Wert gelegt. Durch Einleiten steriler Luft durch eine Glassinterkerze erreichte man die Wachstumsbedingungen, die für eine hohe Enzymaktivität notwendig

waren. Die Generationszeit in der exponentiellen Phase betrug dann 80 min. Ein Überschäumen wurde durch Zugabe von 5 Tropfen Silicon-Antischaumemulsion verhindert.

Bei Streptococcus faecalis genügte es, die beimpfte 18 l-Kultur mit einem Magnetrührer kräftig zu durchmischen. Durch Messung der optischen Dichte bei 578 nm im Photometer der Firma Eppendorf wurde das Wachstum der Kulturen verfolgt. Nach dem Erreichen der gewünschten Wachstumsphase wurde Eis zugegeben und sofort geerntet.

2.5. Gewinnung von UDP-aktivierten Zellwandvorstufen

Die Gewinnung der UDP-aktivierten Zellwandvorstufen aus Staphylococcus aureus, Kopenhagen, ist in Tab.3 zusammengefaßt:

Nukleotid	Herstellung
1) UDP-MurNAc-Ala-DGlu	Anreicherung im Wandmedium A ohne Lysin
2) UDP-MurNAc-Ala-DGlu-Lys	Anreicherung im Wandmedium A
3) UDP-MurNAc-Ala-DGlu-Lys-DAla	Abspaltung von D-Alanin aus Verbindung 4 mit einer DD-Carboxypeptidase aus Streptomyces R39
4) UDP-MurNAc-Ala-DGlu-Lys-DAla-DAla	Anreicherung im Wandmedium B.

Tabelle 3

2.5.1. Gewinnung von UDP-MurNAc-Dipeptid, -Tripeptid und -Pentapeptid durch Anreicherung im Wandmedium A und B.

Zur Anreicherung von UDP-aktivierten Mureinvorstufen in den Wandmedien A und B wurde die Bakterienkultur bis zur Mitte der logarithmischen Phase gezogen. Die Zellen wurden mit einer Zentrifuge (5ooo × g, 15 min) geerntet und schnell in das entsprechende Wandmedium überführt. Nach 2-stündiger Inkubation bei 37°C wurden die Zellen abzentrifugiert (5ooo × g, 15 min) und die UDP-MurNAc-Peptide durch Trichloressigsäure-Extraktion bei 0°C und anschließender Sephadex-Gelfiltration gewonnen (Stickgold und Neuhaus, 1967).

UDP-MurNAc-Pentapeptide wurden anschließend durch absteigende Papierchromatographie in Laufmittel A aus dem Filtrat isoliert. Die Trennung der im Filtrat angereicherten UDP-MurNAc-Tripeptide und UDP-MurNAc-Dipeptide, die durch Papierchromatographie nicht durchführbar ist (Hammes und Neuhaus, 1973), gelang durch Säulenchromatographie mit DEAE-Zellulose.

2.5.2. Herstellung von UDP-MurNAc-Tetrapeptid

Die Herstellung von UDP-MurNAc-Tetrapeptid erfolgte nach der von W.P.Hammes und F.C.Neuhaus (1974) beschriebenen Methode.

UDP-MurNAc-Ala-$\underline{D}$Glu-Lys-$\underline{D}$Ala wurde aus UDP-MurNAc-Pentapeptid (Verbindung 4 in Tabelle 2) mit einer DD-Carboxypeptidase aus Streptomyces R 39 (Leyh-Bouille et al., 1972) hergestellt.

Der Reaktionsansatz enthielt:

5,8 µMol UDP-MurNAc-Ala-DGlu-Lys-DAla-DAla

95 µMol Tris HCl, pH 7,5

9,5 µMol Mg^{2+}

und Enzym (4 mg Protein) in einem Gesamtvolumen von 1.35 ml. Der Ansatz wurde 6o min lang bei 37°C inkubiert; beendet wurde die Reaktion durch kurzes Aufkochen im Wasserbad. Das ausgefällte Protein wurde abzentrifugiert. Zur Entfernung von nicht umgesetzten UDP-MurNAc-Pentapeptid wurden dem Überstand 5,8 µMol Vancomycin zugesetzt. Der entstehende amorphe Niederschlag wurde abzentrifugiert. Die vollständige Abtrennung des Proteins, der Salze und des Antibiotikums gelang durch Sephadex Gelfiltration mit 2 kombinierten Säulen (G 25 und G 5o). Die abschließende Reinigung erreichte man durch mehrmalige Papierchromatographie im Laufmittel A. Schließlich führte man noch eine Sephadex Gelfiltration durch, entfernte den flüchtigen Puffer 3 und bestimmte am Zeiss-Photometer die Konzentration.

2.6. Herstellung von radioaktiv markiertem D-Alanyl-D-Alanin

2.6.1. Enzymatische Synthese von D(^{14}C)Ala-D(^{14}C)Ala

Die enzymatische Synthese von D(^{14}C)Ala-D(^{14}C)Ala wurde in vitro mit einer partiell angereicherten D-A lanin : D-Alanin Ligase aus Streptococcus faecalis hergestellt. Der Inkubationsansatz enthielt in einem Gesamtvolumen von 1.44 ml:

3 µMol D(^{14}C)Ala (37 mCi/mMol)

75 µMol KCl

15 µMol MgCl

75 µMol Tris HCl, pH 7.8

6 µMol ATP (pH 7.o)

Der Ansatz wurde bei 37°C inkubiert und nach 6o min durch 3 min langes Abkochen im Wasserbad abgestoppt.

Die Trennung von Substrat und Dipeptid erfolgte durch Dünnschichtchromatographie in Laufmittel B. Die Ausbeute betrug 1.2 µMol D(^{14}C)Ala-D(^{14}C)Ala, das entspricht 8o %.

2.6.2. Synthese von D-Alanyl-D-(^{14}C)Alanin

2.6.2.1. Synthese von t-BOC-DAla-N-Hydroxysuccinimid

Die Synthese wurde nach der Vorschrift von Nieto and Perkins (1971) durchgeführt. Der Ansatz enthielt:

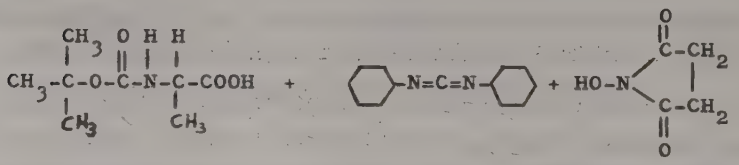
lo mMol t-BOC-D-Ala = 1.89 g
(Beachem fine chenicals, Calif.,USA)

lo mMol N-hydroxysuccinimid = 1,15 g
(Merck)

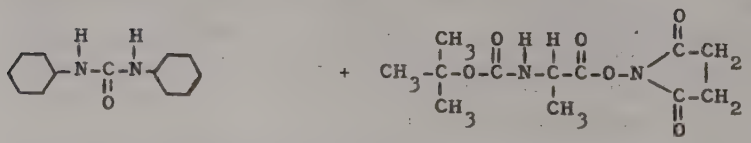
lo mMol Dicyclohexycarbodiimid = 2,o6 g
(Fluka AG, Buchs SG Schweiz)

Dioxan (frisch dest.) = 25 ml

Folgende Reaktion wurde durchgeführt:



t-BOC-D-Ala + Dicyclohexylcarbodiimid + N-Hydroxysuccinimid



Dicyclohexylharnstoff + t-BOC-DAla-O-succinimid

N-hydroxysuccinimid und t-BOC-DAla wurden in Dioxan gelöst. Unter ständigem Rühren wurde Dicyclohexylcarbodiimid zugegeben. Die Reaktionszeit betrug 4 Stunden bei Raumtemperatur. Danach wurde der unlösliche Dicyclohexylharnstoff abfiltriert und der Überstand am Rotationsverdampfer eingeengt; dabei kristallisierte das Produkt aus. Nach der Umkristallisation in Äther wurde die Reinheit durch eine Schmelzpunktbestimmung untersucht.

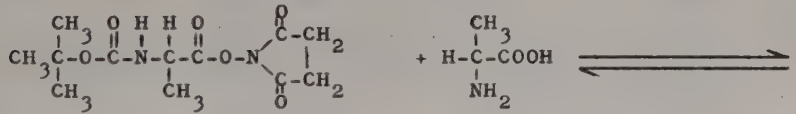
Gemessener Schmelzpunkt : 150°C
Literatur Schmelzpunkt : 147-149°C (Nieto and Perkins, 1971).

2.6.2.2. Umsetzung von t-BOC-DAla-O-Succinimid mit D(^{14}C)Alanin

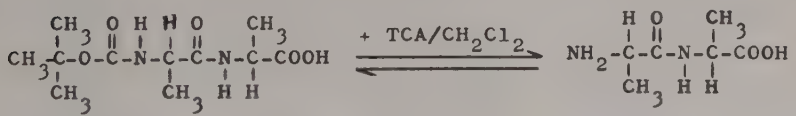
Die Umsetzung wurde nach der Vorschrift von Nieto et al. 1973 durchgeführt. Der Ansatz enthielt:

250 µCi D(^{14}D)Ala	(37 mCi/mMol)
12,97 mg	t-BOC-D-Ala-O-Succinimid
12,97 mg	NaHCo (Merck)
490 µl	Acetonitril (Merck)
400 µl	dest.Wasser

Reaktionsgleichung:



t-BOC-DAla-O-succinimid + D-(^{14}C)Alanin



t-BOC-D-Alanyl-D-(^{14}C)Alanin D-Alanyl-D(^{14}C)Alanin

Das Inkubationsgemisch wurde 2 Stunden bei Raumtemperatur leicht geschüttelt. Anschließend wurde am Rotationsverdampfer zur Trockne eingeengt. Die Abspaltung der BOC-Schutzgruppe erfolgte bei 0°C unter Zugabe von 1.2 ml einer eisgekühlten Mischung aus Trifluoressigsäure und Dichlormethan 1:1 (v/v) zum trockenen Reaktionsprodukt. Die Inkubationszeit im Eisbad betrug 5 min. Anschließend ließ man die Mischung noch 1o min bei Raumtemperatur stehen und dampfte dann zur Trockne ein. Der Rückstand wurde in 1,2 ml 8o %igen Eisessig wieder aufgelöst und abermals zur Trockne eingedampft. Dieser Rückstand wurde in H_2O aufgenommen und auf DC-Alufolien Kieselgel 6o (Merck) in Laufmittel B chromatographiert.

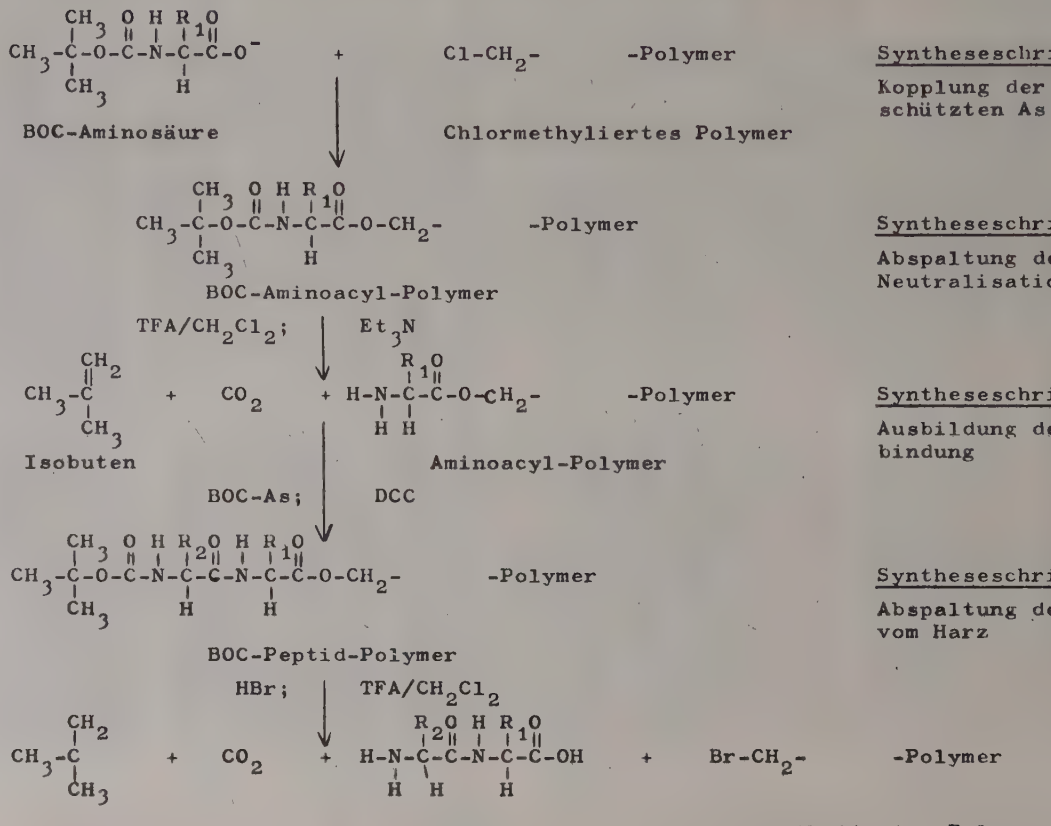
Die Ausbeute an D-Alanyl-D(^{14}C)Alanin betrug 6,28 µMol (= 93 %).

2.6.3. Synthese von D-(^{14}C)Alanyl-D-Alanin

Die Synthese wurde nach Merrifield (1963, 1964, 1969), Merrifield und Corigliano (1968), Stewart und Joung (1969), Schleifer und Krause (1971) durchgeführt.

Die Peptidsynthese erfolgte nach der Festkörpermethode von Merrifield gemäß den in Abb. 4 und Tab.4 gezeigten Schemata.

Abb.4: Reaktionsschema der Festkörper-Peptidsynthese nach Merrifield



Tab.4: Schema der Operationen bei der Merrifield-Peptid-synthese

		Volumen (ml)	Zeit (min)
1) Waschen mit Äthanol	3x	1o	3
2) Waschen mit CH_2Cl_2	1x	1o	2o
3) TFA/CH_2Cl_2 (1:1; v/v)	2x	1o	1o
4) Waschen mit CH_2Cl_2	3x	1o	3
5) Waschen mit Äthanol	3x	1o	3
6) Waschen mit CH_2Cl_2	3x	1o	3
7) Et_3N/CH_2Cl_2 (12:88; v/v)	2x	1o	6
8) Waschen mit CH_2Cl_2	6x	1o	3
9) t-BOC-D-(^{14}C)Alanin in CH_2Cl_2		2,5	1o
1o) DCCI in CH_2Cl_2		1	12o
11) Waschen mit CH_2Cl_2	3x	1o	3
12) Waschen mit Eisessig	3x	1o	3
13) Waschen mit Äthanol	6x	1o	3

Nach dem letzten Waschvorgang (Tab.4, Schritt 13) wurde das t-BOC-D-(^{14}C)Alanyl-D-Alanin-Polymer in absolutem Äthanol suspendiert und in das Abspaltungsgefäß gegeben.

2.6.3.1. Synthese von t-BOC-D-(^{14}C)Alanin

Die Synthese von t-BOC-D-(^{14}C)Alanin erfolgte nach der modifizierten Methode von Schwyzer et al. (1959). Der Reaktionsansatz enthielt:

25o Ci D(^{14}C)Ala und 37 mCi/mMol
9,9 µMol DAla (Merck)
7o µMol Azidoameisensäuretertiärbutylester (EGA-Chemie, Sternheim, BRD)
5o µMol Magnesiumoxid
135 µl peroxifreies Dioxan
68 µl Wasser

Der Ansatz wurde 2o Stunden bei 45°C gerührt. Aus dem abgekühlten Reaktionsgemisch wurde das Magnesiumoxid durch Zentrifugieren entfernt und der Überstand auf 3 DC-Alufolien Kieselgel 6o (Merck) strichförmig aufgetragen und in Laufmittel C chromatographiert. Die t-BOC-D-(^{14}C)Alanin-Bande wurde anschließend ausgeschnitten und mit Methanol extrahiert. Die Ausbeute betrug 8o %.

2.6.3.2. Kopplung von t-BOC-D-Alanin an das Merrifield-Polymer

Nach der Methode von Merrifield (1964) synthetisiertes t-BOC-D-Alanin-Polymer wurde von Herrn P.Seidl zur Verfügung gestellt. Für die Synthese wurde ein Polystyrol-Polymer (Fluka) mit folgenden Eigenschaften verwendet: 2 % Divinylbenzol; 2oo-4oo mesh; 3,5 mMol Cl/g Harz.

2.6.3.3. Schrittweise Synthese von t-BOC-D-(^{14}C)Alanyl-D-Alanin-Polymer

loo mg des mit t-BOC-D-Alanin substituierten Harzes (das entspricht 58 µMol D-Alanin) wurde in das Reaktionsgefäß eingefüllt und lo min mit frisch hergestellten absoluten Äthanol leicht geschüttelt, um das Harz quellen zu lassen.

Anschließend wurde nach dem Operationsschema in Tab. 4 gearbeitet.

2.6.3.4. Abspaltung des Dipeptides D-(^{14}C)Alanyl-D-Alanin vom Polymer

Die Abspaltung des Dipeptides vom Polymer wurde durch Behandlung mit HBr/TFA erreicht (Guttmann und Boissonas, 1959). Unter diesen Bedingungen wird auch die α-Amino-Schutzgruppe von D-(^{14}C)Alanin abgespalten.

Nach dem Absaugen des abs. Äthanols aus dem Abspaltungsgefäß wurde zu t-BOC-D(^{14}C)Ala-DAla-Polymer 5 ml TFA/Ch_2Cl_2 = 1:1 (v/v) gegeben, und HBr-Gas aus einer Stahlflasche (Baker Chemikals BV Deventer, Holland) eingeleitet. Nach 15 min wurde Fraktion 1 abgesaugt und erneut 5 ml TFA/Ch_2Cl_2 = 1:1 (v/v) zugegeben. Nach weiteren 3o min wurde Fraktion 2 abgesaugt und 5 ml TFA/Ch_2Cl_2 = 1:1 (v/v) zugegeben; nach weiteren 45 min wurde Fraktion 3 abgesaugt.

Die einzelnen Fraktioen wurden sofort einrotiert und zur vollständigen Entfernung der TFA noch mehrmals mit Methanol und Methanol/H_2O 1:1 (v/v) aufgenommen und einrotiert. Die vereinigten mit Wasser aufgenommenen Fraktionen wurden anschließend in Laufmittel B chromatographiert.

Die erhaltenene D-(^{14}C)Alanyl-D-Alanin-Bande wurde mit Wasser eluiert und das Kieselgel vom Überstand abzentrifugiert. Der Überstand wurde einrotiert und das D-(^{14}C)Alanyl-D-Alanin-Dipeptid in H_2O aufgenommen.

Die Ausbeute betrug 3o % D-(^{14}C)Alanyl-D-Alanin, die spez. Aktivität: 3o cpm/pMol. Die Menge an t-BOC-D-(^{14}C)Alanin, die an das t-BOC-D-Alanin-Polymer nicht koppelte, betrug 32 % und konnte zurückgewonnen werden.

Ein erheblicher Verlust entstand durch Adhäsion von t-BOC-D-(^{14}C)Alanyl-D-Alanin-Polymer an der Glaswand des Reaktionsgefäßes.

2.6.4. Reinigung der radioaktiv markierten Dipeptide

Die Reinigung der Dipeptide erfolgte mit einer Ionenaustauschersäule (Dowex H^+ 5o W-XB, 2.5 x o.5 cm). Auf die mit HCl (o.2 mol/l) aequilibrierte Säule wurde 1 ml Dipeptid, gelöst in o,2 n HCl, aufgetragen. Dann wurde die Säule 2 x mit o.5 ml HCl (o.2 mol/l), 4 x mit o.5 ml H_2O und 2 x mit o.5 ml NH_4OH (1 mol/l) gewaschen. Das Dipeptid wurde anschließend mit 2 x o.5 ml NH_4OH (33 %) von der Säule eluiert und im N_2-Strom bei 3o°C getrocknet. Der Rückstand wurde anschließend in einer definierten Menge Wasser aufgenommen und die Radioaktivität bestimmt.

2.7. Herstellung von radioaktiv markierten UDP-MurNAc-Peptiden

2.7.1. Enzymatische Synthese von UDP-MurNAc-Ala-DGlu-(^{14}C)Lys

Zur Synthese wurde eine UDP-MurNAc-Ala-DGlu : Lys-Ligase aus Bifidobacterium globosum DSM 2oo92 (Hammes et al. 1977) verwendet, das von R. Neukam zur Verfügung gestellt wurde. Der Reaktionsansatz enthielt:

8 µMol ATP
16 µMol $MgCl_2$
4o µMol Tris HCl, pH 8,4
2.36 µMol L-Lys
15o µCi L(^{14}C)Lys 318 mCi/mMol
7.o8 µMol UDP-MurNAc-Ala-DGlu

und Enzym (o.4 mg Protein) und Wasser in einem Gesamtvolumen von 2.o ml. Man ließ den Ansatz 6o min lang bei 37°C reagieren und führte mit dem gesamten Ansatz eine Sephadex Gelfiltration mit Sephadex G 25 und G 5o durch, um das Protein und nicht umgesetztes L-(^{14}C)Lysin von den UDP-MurNAc-Peptiden abzutrennen. Die Ausbeute bei diesem Schritt betrug

85 % UDP-MurNAc-Ala-DGlu-(^{14}C)Lys. Die Trennung von nicht umgesetzten Substrat und gebildetem UDP-MurNAc-(^{14}C)Tripeptid wurde mit DEAE Zellulose-Chromatographie durchgeführt. Die Tripeptid enthaltenden Fraktionen wurden gesammelt und der Triäthylamin-Puffer am Rotationsverdampfer entfernt. Dieser Reinigungsschritt brachte einen Verlust von 5.5 %.

2.7.2. Enzymatische Synthese von radioaktiv markierten UDP-MurNAc-Pentapeptiden

Die in verschiedenen Positionen markierten UDP-MurNAc-Pentapeptide wurden mit einer UDP-MurNAc-Ala-DGlu-Lys : DAla-DAla Ligase (ADP) aus Streptococcus faecalis ATCC 8043 hergestellt (Neuhaus und Struve 1965). Die synthetisierten UDP-MurNAc-Pentapeptide sind in Tabelle 5 zusammengefaßt.

2.7.2.1. Enzymatische Synthese der UDP-MurNAc-Pentapeptide mit radioaktiven D-Alaninresten.

Für die Synthese der UDP-MurNAc-Pentapeptide (Tab.5, Verbindung 1, 2, 3) wurden folgende Konzentrationen im Reaktionsansatz gewählt:

Tris HCl, pH 7.8	: 30 mmol/l
ATP	: 10 mmol/l
$MgCl_2$	: 10 mmol/l
UDP-MurNAc-Ala-DGlu-Lys	: 3 mmol/l
D(^{14}C)Ala-DAla oder DAla-D(^{14}C)Ala oder D(^{14}C)Ala-D(^{14}C)Ala	: 1 mmol/l

und UDP-MurNAc-Tripeptid : DAla-DAla-Ligase aus Streptococcus faecalis (2.4 mg Protein/µMol DAla-DAla) in einem Gesamtvolumen von 0.5 bis 4 ml.

Tab.5: Herstellungsmethoden von radioaktiv markierten (^{14}C) UDP-MurNAc-Pentapeptiden

1) UDP-MurNAc-Ala-DGlu-Lys-D(^{14}C)Ala-DAla	aus UDP-MurNAc-Ala-DGlu-Lys	und D(^{14}C)Ala-DAla	
2) UDP-MurNAc-Ala-DGlu-Lys-DAla-D(^{14}C)Ala	aus UDP-MurNAc-Ala-DGlu-Lys	und DAla-D(^{14}C)Ala	
3) UDP-MurNAc-Ala-DGlu-Lys-D(^{14}C)Ala-D(^{14}C)Ala	aus UDP-MurNAc-Ala-DGlu-Lys	und D(^{14}C)Ala-D(^{14}C)Ala	
4) UDP-MurNAc-Ala-DGlu-(^{14}C)Lys-DAla-DAla	aus UDP-MurNAc-Ala-DGlu-(^{14}C)Lys	und DAla-DAla	

Die Inkubation wurde im Wasserbad bei 37°C durchgeführt. Nach einer Reaktionszeit von 6o min wurden die MurNAc-Peptide durch eine Sephadex-Gelfiltration (Sephadex G 25 und G 5o) abgetrennt, und der Triäthylaminpuffer entfernt. Die Ausbeute an radioaktiv markierten UDP-MurNAc-Peptiden betrug nach diesem Reaktionsschritt 85-9o %.

UDP-MurNAc-Pentapeptid wurde von nicht umgesetzten UDP-MurNAc-Tripeptid durch Papierchromatographie in Laufmittel A abgetrennt. Die UDP-MurNAc-Pentapeptid enthaltende Bande wurde anschließend mit Wasser eluiert, konzentriert und über Sephadex G 25 entsalzt. Dabei trat ein weiterer Verlust an UDP-MurNAc-Pentapeptid von 5 % auf. Die Konzentrationen wurden im Zeiss-Photometer bei einer Wellenlänge von 25o, 26o und 28o nm bestimmt.

Durch Zugabe von unmarkierten UDP-MurNAc-Pentapeptid wurde eine spezifische Aktivität von ca. 3o cpm/pMol eingestellt.

2.7.2.2. Enzymatische Synthese von L-(^{14}C)Lysin markiertem UDP-MurNAc-Pentapeptid

Zur Synthese von UDP-MurNAc-Ala-DGlu-(^{14}C)Lys-DAla-DAla (Verbindung 4 in Tabelle 5) wurden folgende Konzentrationen im Reaktionsansatz gewählt:

Tris HCl, pH 7.8	: 15 mmol/l
ATP	: 1o mmol/l
$MgCl_2$	: 1oo mmol/l
UDP-MurNAc-Ala-DGlu-(^{14}C)Lys	: o,3 mmol/l 92 cpm/
DAla-DAla	: 2 mmol/l

und Enzym in einem Volumen von 6.o ml.

Die Reaktion wurde im Wasserbad bei 37°C 6o min lang durchgeführt. Nach dem Einengen des Volumens auf 2.o ml bei 3o°C konnte das gesamte Reaktionsgemisch der Sephadex-Gelfiltration unterworfen werden. Alle weiteren Isolierungs- und Reinigungsschritte wurden wie unter 2.7.2.1. beschrieben, durchgeführt.

2.7.3. Enzymatische Synthese radioaktiv markierter UDP-MurNAc-Tetrapeptide

UDP-MurNAc-Ala-DGlu-(^{14}C)Lys-DAla wurde aus UDP-MurNAc-Ala-DGlu-(^{14}C)Lys-DAla-DAla und UDP-MurNAc-Ala-DGlu-Lys-D(^{14})Ala-aus UDP-MurNAc-Ala-DGlu-Lys-D(^{14}C)Ala-DAla mit einer DD-Carboxypeptidase aus Streptomyces R39 analog der bei 2.5.2. beschriebenen Methode hergestellt.

2.8. Enzymgewinnung aus Gaffkya homari

Die in 18 l AC-Medium gezüchteten Zellen von G. homari wurden in der spätlogarithmischen Phase unmittelbar vor Übergang der Kultur in die Verzögerungsphase bei einer optischen Dichte von o,7 (gemessen bei 578 nm im Eppendorf-Photometer) in einer Durchlaufzentrifuge geerntet. Mit einem Gummispatel wurden die Zellen aus dem Rotor geholt, in Puffer A bei 4°C suspendiert. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert (3o ooo × g, 2o min). Die Ausbeute betrug etwa 12 g (Naßgewicht) pro 18 l Medium.

2.8.1. Gewinnung des Zellwand-Membran-Enzymkomplexes aus G.homari

Die Gewinnung des Zellwand-Membran-Enzymkomplexes wurde nach W. Hammes und O. Kandler (1976) durchgeführt. Zur Vermeidung eines Aktivitätsverlustes wurden die in Puffer A abzentrifugierten Zellen von G. homari sofort weiterverarbeitet.

Tab.6: Zusamnenfassung der hergestellten Zellwandvorstufen

Nukleotid	Herstellung
1) UDP-MurNAc-Ala-DGlu	Anreicherung im Wandmedium A ohne Lysin
2) UDP-MurNAc-Ala-DGlu-Lys	Anreicherung im Wandmedium A
3) UDP-MurNAc-Ala-DGlu-(^{14}C)Lys	Enzymatische Anlagerung von L(^{14}C)Lys an Nukleotid 1
4) UDP-MurNAc-Ala-DGlu-Lys-DAla	Abbau der Verbindung 7 mit einer DD-Carboxypeptidase
5) UDP-MurNAc-Ala-DGlu-(^{14}C)Lys-DAla	Abbau der Verbindung 8 mit einer DD-Carboxypeptidase
6) UDP-MurNAc-Ala-DGlu-Lys-D(^{14}C)Ala	Abbau der Verbindung 9 mit einer DD-Carboxypeptidase
7) UDP-MurNAc-Ala-DGlu-Lys-DAla-DAla	Anreicherung im Wandmedium B
8) UDP-MurNAc-Ala-DGlu(^{14}C)-Lys-DAla-DAla	Enzymatische Anlagerung von DAla-DAla an Nukleotid 3
9) UDP-MurNAc-Ala-DGlu-Lys-D(^{14}C)Ala-DAla	Enzymatische Anlagerung von D(^{14}C)Ala-DAla an Nukleotid 2
10) UDP-MurNAc-Ala-DGlu-Lys-DAla-D(^{14}C)Ala	Enzymatische Anlagerung von DAla-D(^{14}C)Ala an Nukleotid 2
11) UDP-MurNAc-Ala-DGlu-Lys-D(^{14}C)Ala-D(^{14}C)Ala	Enzymatische Anlagerung von D(^{14}C)Ala-D(^{14}C)Ala an Nukleotid 2

Dazu wurden die Zellen erneut in Puffer A suspendiert und gab so lange Plastikperlen (Polystyrol) zu, bis eine honigartige Konsistenz erreicht war. Außerdem wurden noch ein Tropfen Silikon Antischaumemulsion und eine Spatelspitze Desoxyribonuklease (Boehringer) der Mischung zugesetzt. Anschließend wurden die Zellen bei 0°C im Bühler-Homogenisator (4500 U/min) 15 min lang aufgebrochen, die Perlen mit einer Glasfritte (Schott G1) abgesaugt und das Filtrat bei 30 000 × g 20 min lang zentrifugiert. Der gelbe Überstand wurde verworfen. Das Sediment bestand aus zwei Fraktionen der oberen, weißen Zellwand-Membran-Enzymfraktion, die etwa 30 % des Sediments betrug und mit einem Spatel leicht abgehoben werden konnte, und dem unteren gelbgrünen Bodensatz, der die nicht aufgeschlossenen Zellen enthielt. Der Zellwand-Membran-Enzymkomplex wurde gesammelt, in Puffer A noch einmal gewaschen, anschließend im gleichen Puffer homogenisiert und in flüssigem Stickstoff gelagert. Auch nach Monaten trat so kein Aktivitätsverlust auf. Alle Arbeiten zur Enzymgewinnung wurden bei 4°C durchgeführt.

Der Proteingehalt, bestimmt nach Lowry et al. (1951) betrug je nach Ansatz 9-12 mg/ml. Der Muropeptidgehalt, bezogen auf den Glutaminsäuregehalt nach dem Waschen mit 2 % Natriumdodecylsulfat, betrug 15 µmol/ml.

2.8.2. Gewinnung des Membran-Enzymkomplexes aus G.homari

Der nach W.Hammes und F.C.Neuhaus (1974) hergestellte Membran-Enzymkomplex wurde von W.Hammes zur Verfügung gestellt. Der Proteingehalt der verwendeten Fraktion betrug 47 mg/ml.

2.9. Gewinnung der UDP-MurNAc-Tripeptid : DAla-DAla-Ligase aus Streptococcus faecalis

Die Zellen von Streptococcus faecalis wurden in der spätlogarithmischen Phase bei einer optischen Dichte von E_{578} = 1,7 in einer Durchlaufzentrifuge geerntet. Anschließend wurden die Zellen in o,ol m Phosphatpuffer pH 6.8 suspendiert, abzentrifugiert (3o ooo × g, 2o min) und wie unter 2.8.1. beschrieben aufgebrochen. Die Aufbrechzeit wurde auf 2o min verlängert um möglichst alle Zellen aufzubrechen. Anschließend wurden die Plastikperlen wieder mit einer Glasfritte (Schott G 1) abgesaugt. Zur Abtrennung der Zellwände und der ganzen Zellen wurde das Filtrat 3o min bei 35ooo × g zentrifugiert. Mit dem Überstand führte man eine Ammonsulfatfällung durch.

Die zum Erreichen der gewünschten Konzentration erforderliche Ammonsulfatmenge wurde der Tabelle aus "Data for Biochemical Research" (Dawson et al., 1969) entnommen. Die Fraktion 1 (0-55 %) wurde verworfen, die Fraktion 2 (55 - 7o %) wurde in Tris-HCl Puffer B aufgelöst, in Portionen abgefüllt und bei -3o°C gelagert. Alle Arbeitsvorgänge wurden ohne längere Unterbrechungen bei 4°C durchgeführt.

Der nach Lowry et al. bestimmte Proteingehalt des Enzyms betrug 63 µg/µl.

2.1o. Proteinbestimmung

Der Proteingehalt der Enzymlösungen wurde nach der Methode von Lowry et al. (1951) bestimmt.

Folgende Lösungen wurden hergestellt:

A) 1 ml 1 %ige $CuSO_4$-Lösung
1 ml 2 %ige Natriumtartrat-Lösung
98 ml 2 %ige Na_2CO_3-Lösung in o,1 m NaOH

$CuSO_4$- und Na-tartrat-Lösung wurden vor der Zugabe der basischen Na_2CO_3-Lösung gemischt, um eine Bildung von $Cu(OH)_2$ zu vermeiden.

B) Phenolreagenz (Folin-Ciocalteus-Reagenz, Merck) wurde unmittelbar vor Gebrauch mit dest. Wasser im Verhältnis 1 : 1 verdünnt.

Zur Erstellung der Eichkurve wurde bei jeder Versuchsreihe Rinderserumalbumin (= BSA-Lösung, Konzentration: o,25 mg/ml) als Standard verwendet.

2.11. In vitro Mureinsynthese

2.11.1. Messung der Radioaktivität

Die Radioaktivität wurde durch Flüssigkeitsszintillationsspektrometrie mit Hilfe eines Flüssigkeitsszintillationsspektrometers der Firma Packard, Modell 2425, in folgenden Szintillationsflüssigkeiten bestimmt:

Szintillationsflüssigkeit A (Hammes und Neuhaus, 1974) für wasserfreie Proben:

25o mg POPOP (1,4-Di [2-(5-phenyloxazolyl)] benzen)
3 g PPO (2,5 Diphenyloxazol)
looo ml Toluol

Szintillationsflüssigkeit B (Patterson und Greene, 1965) für wasserhaltige Proben:

1.2 g POPOP
48.o g PPO
6 l Triton-X-loo
12 l Toluol

2.11.2. Standardreaktionsansatz I zur in vitro Mureinsynthese

Für den Einbau von radioaktiv markierten MurNAc-Peptiden aus UDP-MurNAc-Pentapeptid oder UDP-MurNAc-Tetrapeptid in das Murein wurde der von Hammes und Kandler (1976) beschriebene Reaktionsansatz verwendet. Folgende Konzentrationen wurden verwendet:

Magnesiumacetat	: 42 mmol/l
Ammoniumchlorid	: 8.4 mmol/l
ATP, pH 7,o	: 3,3 mmol/l
Tris-Hydrochlorid pH 8,8	: 52 mmol/l
Dithiothreitol	: 1,7 mmol/l
UDP-GlcNAc	: o.83 mmol/l
UDP-MurNAc-(^{14}C) Pentapeptid oder UDP-MurNAc-(^{14}C)Tetrapeptid	: 4o µmol/l

Die spezifische Radioaktivität betrug je nach Verbindung zwischen 2o und 3o cpm/pmol.

Zellwand-Membran-Enzymkomplex : 6o µg Protein

Gesamtinkubationsvolumen : 6o µl

Die Inkubation wurde bei 25°C im Wasserbad 45 min lang durchgeführt.

2.11.2.1. Bestimmung der Gesamtmenge an neu synthetisiertem Murein

Zur Bestimmung des Gesamtmureins wurden nach Zugabe von 2o µl des Reaktionsansatzes zu 3o µl des Laufmittels A, 4o µl-Aliquots auf Whatman 3 MM Papier strichförmig aufgetragen und wie in 2.13.1. beschrieben chromatographiert. Aus dem getrockneten Chromatogramm wurde dann der Auftragsbereich in der Größe von 3 cm × 1.5 cm ausgeschnitten und die Streifen in Szintillationsflüssigkeit A gezählt.

2.11.2.2. Bestimmung des zellwandgebundenen Mureins

Zur Bestimmung des zellwandgebundenen Mureins wurden 4o µl des Reaktionsgemisches mit o,5 ml einer 2 %igen Natriumdodecylsulfat-Lösung versetzt. Damit wird der Teil des Mureins extrahiert, der nicht kovalent an das vorgefertigte Murein gebunden ist. Die Probe wurde 2 min bei 8 ooo x g zentrifugiert, das Sediment dreimal mit 1 ml 2 %iger Natriumdodecylsulfat-Lösung gewaschen und anschließend mit 1 ml Wasser in Szintillationsgläschen überführt, und die Radioaktivität in Szintillationsflüssigkeit B gemessen.

2.11.2.3. Bestimmung des löslichen Mureins

Das lösliche Murein ergab sich aus der Differenz der Beträge für die Gesamt-Mureinsynthese und das zellwandgebundene Murein.

2.11.2.4. Bestimmung des während der Inkubation abgespaltenen D(^{14}C)Alanins

Wurde im Standardreaktionsansatz I ein UDP-MurNAc-(^{14}C)Peptid verwendet, das in Position 4 oder 5 der Peptiduntereinheit mit D-(^{14})Alanin markiert ist, so konnte das während der Inkubation abgespaltene D-(^{14}C)Alanin auf dem Chromatogramm zur Bestimmung der Gesamtmureinsynthese gemessen werden. Dazu wurde das Chromatogramm in 1 cm breite Streifen unterteilt und 9 Streifen im R_f-Bereich von D-Alanin (R_f = o.71) ausgeschnitten und in Szintillationsflüssigkeit A gezählt.

2.11.2.5. Quantitative Bestimmung der Lipidzwischenprodukte aus dem Standardreaktionsansatz I

Zur Bestimmung der Lipidzwischenprodukte wurde das Chromatogramm, mit dem die Gesamtmureinsynthese bestimmt worden war,

in 1,5 cm breite Streifen unterteilt und in der bekannten Position für Lipid (R_f = o,75) die Radioaktivität von lo Streifen in Szintillationsflüssigkeit A gemessen. Die Summe der Radioaktivität ergab nach Umrechnung die Menge an Lipidzwischenprodukten.

2.11.3. Standardreaktionsansatz II zur in vitro Mureinsynthese

Zur Bestimmung des Einbaues von UDP-(^{14}C)GlcNAc in das neu synthetisierte Murein wurde der modifizierte Standardreaktionsansatz I verwendet.

Magnesiumacetat	: 42 mmol/l
Ammoniumchlorid	: 8.4 mmol/l
ATP	: 3,3 mmol/l
Tris-HCl, pH 8,8	: 52 mmol/l
UDP-(^{14}C)GlcNAc	: o.35 mmol/l (15 cpm/pmol)
UDP-MurNAc-Pentapeptid	: 49 µmol/l
Zellwand-Membran-Enzymkomplex	: 6o µg Protein

Das Reaktionsvolumen betrug 6o µl.
Die Versuchsdurchführung und die Bestimmung der Reaktionsprodukte (Gesamtmureinsynthese, wandgebundenes Murein und Lipidzwischenprodukte) wurden wie bei 2.lo.2. beschrieben, ausgeführt.

2.11.4. Standardreaktionsansatz III zur Bestimmung des MurNAc-(^{14}C)Peptid-Zellwand-Antibiotikum-Komplexes

Zur Bestimmung des MurNAc-(^{14}C)Peptid-Zellwand-Antibiotikum-Komplexes wurde der modifizierte Standardreaktionsansatz I (ohne UDP-GlcNAc) verwendet.

Magnesiumacetat	: 42 mmol/l
Ammoniumchlorid	: 8,4 mmol/l
ATP	: 3,3 mmol/l
Tris-HCl, pH 8,8	: 52 mmol/l
UDP-MurNAc-(^{14}C)Pentapeptid	: 4o µmol/l (34,3 cpm/pmol)
Zellwand-Membran-Enzymkomplex	: 24o µg Protein
Nisin oder Subtilin	: o-1ooo µg/ml

Das Reaktionsvolumen betrug 6o µl.

Nach einer Inkubationszeit von 3o min bei 25°C wurde die Reaktion durch Zugabe von o.5 ml 2 %iger Natriumdodecylsulfat-Lösung gestoppt. Anschließend wurde die Probe 2 min bei 8 ooo × g zentrifugiert, das Sediment dreimal mit 1 ml 2 %iger Natriumdodecylsulfat-Lösung gewaschen und anschließend mit 1 ml Wasser in Szintillationsgläschen überführt, und die Radioaktivität in Szintillationsflüssigkeit B gemessen.

2.11.5. Aktivitätstest des Zellwand-Membran-Enzymkomplexes aus G. homari

Zur Aktivitätsbestimmung des Enzyms aus G. homari wurden Aliquots einer Charge (2o µl) im Standardreaktionsansatz I auf die Mureinsyntheseaktivität hin untersucht und mit der bekannten Aktivität verglichen.

Abbildung 5 zeigt die Abhängigkeit der in vitro Mureinsynthese von der Zeit.

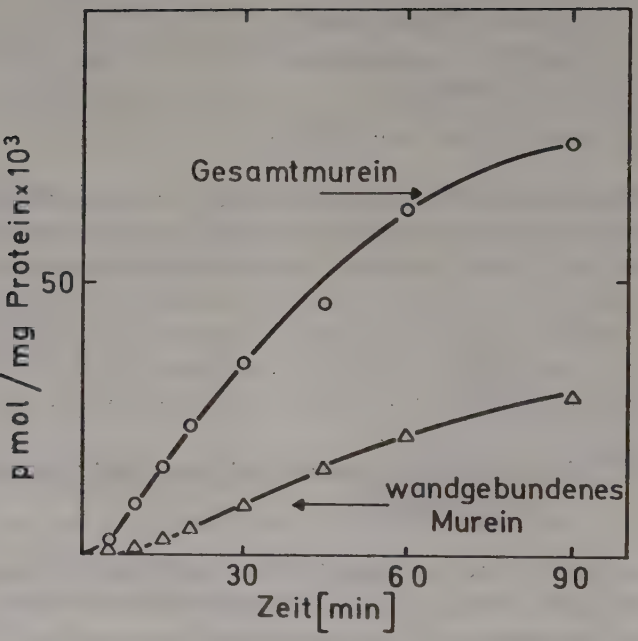


Abb.5:

Abhängigkeit der in vitro Mureinsynthese von der Zeit.

2.11.6. Bestimmung des Gesamtmureins und der lipidaktivierten Zwischenprodukte synthetisiert mit Hilfe des Membran-Enzymkomplexes aus G. homari

2.11.6.1. Bestimmung der Reaktionsprodukte

Zur Bestimmung des Gesamtmureins mit dem Membran-Enzymkomplex wurden die im Standardreaktionsansatz I angegebenen Reaktionsbedingungen gewählt. Es wurden 94 µg Protein/6o µl eingesetzt. Für die Untersuchungen zur Anreicherung der lipidaktivierten Reaktionszwischenprodukte mußte die 2.5-fache Enzymmenge verwendet werden, um eine bessere Ausbeute zu erhalten. Die Durchführung der Untersuchungen und die quantitativen Bestimmungen waren analog der bei 2.11.2.1. und 2.11.2.4. beschriebenen Methoden.

2.11.6.2. Bestimmung der Syntheseraten

Da die Mureinsynthese durch eine anfängliche "lag-phase" und an eine daran anschließende lineare Phase gekennzeichnet ist (Hammes und Neuhaus, 1974b), wurden die Syntheseraten im linearen Teil der Zeitkurve bestimmt. Es wurde 2o µl Aliquots nach 5 und 15 min aus dem Reaktionsgemisch entnommen und in 3o µl Laufmittel A pipettiert. Aliquots von 4o µl wurden wie oben beschrieben auf Whatmann 3 MM strichförmig aufgetragen und in Laufmittel A chromatographiert. Die Syntheseraten wurden dann aus der Differenz der beiden Punkte in der Kinetik errechnet.

2.11.7. Berechnung der Inhibitorkonstanten

Die Bestimmung der Inhibitorkonstanten K_i erfolgte nach Dixon und Webb (1971).

Ist in Gegenwart eines Inhibitors die Hemmung rein kompetitiv, wird im Lineweaver-Burk-Diagramm aus den Schnittpunkten der

Geraden mit der Abszisse - $1/K_m$ (ohne Inhibitor) bzw. $1/K_p$ (mit Inhibitor) - die Imhibitorkonstante K_i nach Dixon und Webb bestimmt. K_p ist die effektive Michaeliskonstante in Gegenwart des Inhibitors der Konzentration i.

Aus der Formel $K_p = K_m (1 + i/K_i)$ läßt sich K_i folgendermaßen berechnen:

$$K_p = K_m + \frac{K_m \times i}{K_i}$$

$$K_i K_p = K_i K_m + K_m i$$

$$K_i (K_p - K_m) = K_m i$$

$$K_i = \frac{K_m \times i}{K_p - K_m}$$

$$K_i = \frac{i}{\frac{K_p}{K_m} - 1}$$

2.12. Papier- und Dünnschichtchromatographie

2.12.1. Laufmittel

Laufmittel A:
Isobuttersäure/Wasser/NH_4OH 33 % = 66 / 33 / 2 (V/V/V)

Laufmittel B:
Isopropanol/NH_4OH 33 %/Wasser = 1oo / 12 / 12 (V/V/V)

Laufmittel C:
Chloroform/Methanol/Eisessig = 85 / 1o / 5 (V/V/V)

Laufmittel D:
1 m NH_4-Acetat/Äthanol 96 % = 3 / 7.5 (V/V)

2.12.2. Qualitativer Nachweis der Mureinsynthese auf DC-Kieselgel G 6o Fertigplatten (Merck)

Zum Nachweis der, bei der in vitro Mureinsynthese entstehenden Produkte, wurde neben der Papierchromatographie auf Whatman 3 MM auch die Dünnschichtchromatographie mit Fertigplatten Kieselgel 6o (Merck) und Laufmittel A angewendet. Die Auswertung wurde mit einem Gasdurchfluß-Scanner (Dünnschicht-Scanner II LB 2722, Firma Berthold) durchgeführt.

Folgende R_f-Werte wurden in Laufmittel A gemessen:

R_f (Gesamtmenge an synthetisiertem Murein) = o
R_f (UDP-MurNAc-(^{14}C)Pentapeptid) = o,o9
R_f (UDP-(^{14}C)GlcNAc) = o,16
R_f (MurNAc-(^{14}C)Pentapeptid-Phospholipid = o,48

2.12.3. Quantitative Chromatographie zur Bestimmung der Produktbildung aus UDP-MurNAc-Pentapeptid und UDP-GlcNAc.

Die Bestimmung der Syntheseprodukte bei der in vitro Mureinsynthese wurde durch absteigende Papierchromatographie in Laufmittel A durchgeführt. Whatman 3 MM-Papier wurde dabei in lo Bahnen von 4 cm × 5o cm unterteilt. Am Ursprung wurden Aliquots der Reaktionsprodukte strichförmig (2 cm × o.5 cm) aufgetragen. Die Laufzeit der Chromatogramme betrug etwa 18 Stunden bei 25°C. Die Papierchromatogramme wurden anschließend im Luftstrom getrocknet und die einzelnen Bahnen in 1.5 cm breite Streifen unterteilt. Die Radioaktivität der einzelnen Streifen im R_f-Bereich der Produkte konnte anschließend in Szintillationsflüssigkeit A bestimmt werden. Für die identifizierten Reaktionsprodukte ergaben sich folgende R_f-Werte:

Anzahl der radioaktiven Streifen	R_f-Werte	Reaktions-Produkt
1	o	Gesamt-Murein
3	o.3	Substrat
6	o.7	Alanin
5	o.75	Lipidzwischenprodukt

2.12.4. Präparative Papierchromatographie zur Isolierung vo nucleotidaktivierten Mureinvorstufen

Die Trennung von UDP-MurNAc-Tripeptid und UDP-MurNAc-Tetrap tid von UDP-MurNAc-Pentapeptid wurde mittels Papierchromato graphie (Whatman 3 MM) durchgeführt. Dazu wurden die UDP-haltigen Fraktionen der Sephadex-Gelfiltration strichförmig auf die Ursprungslinie aufgetragen. Die Menge betrug 1oo nmol/cm. Die Trennung erfolgte durch 2o bis 6o-stündige Chromatographieren in Laufmittel A.

Authentische Vergleichssubstanzen wurden an beiden Randzonen zur Identifizierung aufgetragen. Lokalisiert wurden die Banden im UV-Licht und anschließend ausgeschnitten. Zur Entfernung der Restisobuttersäure wurden die Streifen mit Aceton gewaschen; nach dem Trocknen wurde mit Triäthyla (2o mmol/l) eluiert.

2.12.5. Präparative Dünnschichtchromatographie zur Isolieru von radioaktivem D-Alanyl-D-Alanin

Die in Wasser gelösten Reaktionsprodukte wurden strichförmi auf die Ursprungslinie einer DC-Alufolie Kieselgel 6o (Merc aufgetragen. Die Menge betrug 1oo nmol/cm. Zur Identifizier

wurden am Rande authentische Vergleichssubstanzen aufgetragen. Die Trennung erfolgte durch 8-stündiges Chromatographieren im Laufmittel B.

Die DC-Alufolien wurden anschließend gut getrocknet und über Nacht auf Photoplatten exponiert. Die nach dem Entwickeln der Photoplatten schwarz erscheinenden Banden wurden auf die DC-Alufolien durchgepaust. Als Nachweisreagenz für die authentischen Vergleichssubstanzen diente ein Ninhydrin-Sprühmittel folgender Zusammensetzung:

Wassergesättigtes Butanol	: 93o ml
Eisessig	: 7o ml
Ninhydrin (Merck)	: 5 g

Entwickelt wurde bei 1oo°C. Die identifizierte radioaktive D-Alanyl-D-Alanin-Bande wurde dann ausgeschnitten und mit Wasser eluiert.

2.12.6. Präparative Dünnschichtchromatographie zur Trennung von D-(^{14}C)Alanin und t-BOC-D-(^{14}C)Alanin

Nach dem Abzentrifugieren des Magnesiumoxids vom Reaktionsgemisch wurde die gesamte Inkubation auf mehrere DC-Alufolien Kieselgel 6o (Merck) strichförmig aufgetragen (1oo nmol/cm). Zur Identifizierung wurden am Rande authentische Vergleichssubstanzen aufgetragen. Die Trennung erfolgte durch 2-stündiges Chromatographieren in Laufmittel C.

Die DC-Alufolien wurden anschließend gut getrocknet und auf Photoplatten (Bero × ray, Pr 9o) über Nacht exponiert. Die nach dem Entwickeln der Photoplatten schwarz erscheinenden Banden wurden auf die DC-Alufolien durchgepaust. Die Vergleichssubstanzen konnten durch Sprühen mit Ninhydrin-Reagenz und anschließendem Entwickeln bei 1oo°C sichtbar gemacht werden, wobei t-BOC-D-Alanin 5 min lang bei 12o°C

erhitzt werden mußte. Die als t-BOC-D-(^{14}C)Alanin identifizierte Bande wurde ausgeschnitten und mit Methanol eluiert.

2.13. Sephadex Gelfiltration (Stickgold und Neuhaus, 1967)

2.13.1. Sephadex Gelfiltration zur Abtrennung der UDP-aktivierten Mureinvorstufen von Protein und Salzen

Zur Abtrennung der UDP-aktivierten Mureinvorstufen von Protein und Salzen wurden bis zu 3 ml eines Reaktionsansatzes auf zwei hintereinandergeschaltete Sephadex-Säulen (Sephadex G 25, fine, 125 x 3 cm und Sephadex G 5o, fine, 75 x 3 cm) aufgetragen. Die Elution erfolgte mit Triäthylcarbonatpuffer (2o mmol/l) pH 8.o bei einer Geschwindigkeit von 2.o ml/min.

Vom Eluat wurde kontinuierlich die Absorption bei 254 und 26o nm untersucht (Uvicord III 2o89, 2 Kanal UV-Absorptionsmeter, LKB Stockholm) und aufgezeichnet. Gesammelt wurde nur die unmittelbar nach dem Ausschlußvolumen erscheinende Fraktion, deren Absorptionsverhältnisse (28o : 26o und 25o : 26o) für Uridin charakteristisch waren.

Der Triäthylamincarbonatpuffer wurde durch dreimaliges Einengen am Rotationsverdampfer bis zur Trockne, bei maximal 37°C, vollständig entfernt. Die Stabilität der UDP-MurNAc-Peptidvorstufen gegenüber dieser Behandlung wurde von W.P.Hammes (1974a) gezeigt. Die radioaktiv markierte UDP-MurNAc-Peptidvorstufen cochromatographierten mit den unmarkierten, authentischen Substanzen, und es traten keine Zersetzungsprodukte auf.

Die trockenen UDP-MurNAc-Dipeptid und -Tripeptid enthaltenden Sephadex-Fraktionen wurden in 1-2 ml Wasser gelöst und durch DEAE-Cellulose-Chromatographie fraktioniert.

Die Trennung von UDP-MurNAc-Tripeptid, -Tetrapeptid und -Pentapeptid enthaltenden Sephadex-Fraktionen wurden durch Papierchromatographie (Whatman 3 MM) in Laufmittel A erreicht.

2.13.2. Sephadex-Gelchromatographie von Nisin

4o mg Nisin wurden in 2,7 ml Essigsäure (o.2 mol/l) gelöst und auf 2 hintereinandergeschaltete Sephadex-Säulen (Sephadex G 25, fine, 125 × 3 cm; Sephadex G 5o, fine, 75 × 3 cm), die mit Essigsäure (o.2 mol/l) aequilibriert waren, aufgetragen. Die Elution erfolgte ebenfalls mit Essigsäure (o.2 mol/l) bei einer Geschwindigkeit von 2.o ml/min. Vom Eluat wurde kontinuierlich die Absorption bei 2o6 und 254 nm untersucht (Uvicord III 2o89) und aufgezeichnet. Gesammelt wurde nur die Hauptfraktion; zur Entfernung der Essigsäure wurde das pH mit Triäthylamin auf pH 4,2 eingestellt und lyophilisiert. Das gereinigte Nisin war ein weißes voluminöses Pulver.

2.14. DEAE-Cellulose-Chromatographie

Die Methode von Hammes und Neuhaus (1974a) wurde dahingehend modifiziert, daß anstelle des Gradienten aus o.1 mol/l NH_4HCO_3-Puffer pH 8.4 ein o.14 mol/l Triäthylamincarbonat-Puffer pH 8.o verwendet wurde.

Die nach der Sephadex-Gelfiltration erhaltenen Proben wurden auf eine mit o.14 mol/l Triäthylamincarbonat pH 8.o voraequilibrierte DEAE-Cellulose-Säule (Whatman DE 52; 6o × o.9 cm) aufgetragen. Eluiert wurde mit dem gleichen Puffer und Fraktionen mit 75 Tropfen (entsprechend 4.5 ml) wurden gesammelt und ihre Absorption bei 254 und 26o nm im Uvicord III gemessen. Im Elutionsprofil erhielt man 2 Peaks mit dem charakteri-

stischen Absorptionsprofil für Uridin; der erste direkt nach dem Ausschlußvolumen war UDP-MurNAc-Tripeptid der zweite UDP-MurNAc-Dipeptid.

Der Triäthylamincarbonatpuffer wurde wie bei 2.13.1. beschrieben entfernt. Anschließend wurden die Zellwandvorstufen in Wasser wieder aufgenommen und ihre Konzentration im Zeiss-Photometer bestimmt.

2.15. Bestimmung der Phospho-MurNAc-Pentapeptid-Translocase-Aktivität

Die Bildung von C_{55}-PP-MurNAc-(^{14}C)Pentapeptid aus UDP-MurNAc-(^{14}C)Pentapeptid und dem Membran-Enzymkomplex wurde durch eine Perchlorsäurefällung des radioaktiven Produktes gemessen. Der nach W.P.Hammes (1974a) modifizierte Ansatz enthielt:

Bakterielle alkalische Phosphatase (aus E.coli, Boehringer Mannheim)	: o,16 U
$MgCl_2$	: 5o mmol/l
Tris HCl, pH 8,o	: 5o mmol/l
Membran-Enzymkomplex	: 24o µg Protein

und UDP-MurNAc-Ala-DGlu-(^{14}C)Lys-DAla-DAla in einem Gesamtvolumen von 6o µl. Nach der Inkubation bei 25°C wurde die Reaktion durch Zugabe von o.5 ml Perchlorsäurelösung (o,3 mol/l) gestoppt. Der Niederschlag wurde auf einem Membranfilter (o.45 µm der Firma Millipore Corp.) isoliert und die Radioaktivität bestimmt. Dazu wurden die Membranfilter in 1 ml Äthylacetat bei 37°C aufgelöst und in der Szintillationsflüssigkeit B gemessen.

3. Ergebnisse

3.1. Untersuchung der LD- und DD-Carboxypeptidaseaktivität während der Mureinsynthese

Die Untersuchung der LD- und der DD-Carboxypeptidaseaktivitätin der Enzympräparation von Gaffkya homari erfolgt unter Verwendung der in Tabelle 7 aufgeführten radioaktiv markierten UDP-MurNAc-Peptiden. Mit diesen verschiedenen Substraten ist es möglich, den Abbau der Peptiduntereinheiten während der Mureinbiosynthese zu verfolgen und die Aktivität der beiden Carboxypeptidasen zu bestimmen.

3.1.1. Abbau der Peptiduntereinheit von UDP-MurNAc-Pentapeptid während der in vitro Mureinsynthese

Zur Untersuchung der Peptiduntereinheiten im neu synthetisierten Murein wird das Verhältnis von Pentapeptid, Tetrapeptid und Tripeptid zueinander bestimmt. Wie die Tabelle 7 zeigt, gelingt das durch Verwendung von drei UDP-MurNAc-Pentapeptiden, die spezifisch in den Positionen 3, 4 oder 5 der Peptiduntereinheit radioaktiv markiert sind.

Tab.7: Bestimmung der Carboxypeptidase-Aktivität und der Kettenlänge der Peptiduntereinheit im Murein, synthetisiert mit UDP-MurNAc-Pentapeptid oder mit UDP-MurNAc-Tetrapeptid.

Für die Mureinsynthese verwendete Zellwandvorstufe	Abbildg.	Kettenlänge der ins Murein eingebauten Peptiduntereinheiten	Abspaltung von D(^{14}C)Ala durch eine Carboxypeptidase
I UDP-MurNAc-Ala-DGlu-(^{14}C)Lys-DAla-DAla	1A	Tripeptid, Tetrapeptid, Pentapeptid	--
II UDP-MurNAc-Ala-DGlu-Lys-D(^{14}C)Ala-DAla	1C	Tetrapeptid, Pentapeptid	LD
III UDP-MurNAc-Ala-DGlu-Lys-DAla-D(^{14}C)Ala	1B	Pentapeptid	DD
II-III	2A	Tetrapeptid	--
I-II	2C	Tripeptid	--
IV UDP-MurNAc-Ala-DGlu-(^{14}C)Lys-DAla	1D	Tetrapeptid, Tripeptid	--
V UDP-MurNAc-Ala-DGlu-Lys-D(^{14}C)Ala	1E	Tetrapeptid	LD
IV-V	2B	Tripeptid	--

Der Einbau aller MurNAc-Peptide kann mit UDP-MurNAc-Ala-DGlu-(^{14}C)Lys-DAla-DAla als Vorstufe erfaßt werden. Mit UDP-MurNAc-Ala-DGlu-Lys-D(^{14})Ala-DAla wird der Einbau von Pentapeptid- und Tetrapeptiduntereinheiten zusammen gemessen. Aus der Differenz der letzten und der ersten Bestimmung kann dann der Einbau von Tripeptiduntereinheiten berechnet werden. Durch die Verwendung von UDP-MurNAc-Ala-DGlu-Lys-DAla-D(^{14}C)Ala als Vorstufe werden ausschließlich die eingebauten Pentapeptiduntereinheiten erfaßt. Die Differenz zwischen dem Einbau von Pentapeptid und dem Einbau an Radioaktivität aus UDP-MurNAc-Ala-DGlu-Lys-D(^{14})Ala-DAla ergibt dann den Einbau von Tetrapeptid in das Murein. Die Abspaltung von D(^{14}C)Alanin aus Position 4 bzw. 5 aus den UDP-MurNAc-Peptiden gibt darüber hinaus Aufschluß über die Aktivität von DD- bzw. LD-Carboxypeptidasen. In entsprechender Weise kann dann der Einbau der Peptiduntereinheiten mit UDP-MurNAc-Tetrapeptid während des Einbaues in das Murein untersucht werden (Tab.7).

3.1.2. Kinetik der Mureinsynthese aus UDP-MurNAc-Pentapeptid oder UDP-MurNAc-Tetrapeptid

Bei der *in vitro* Mureinsynthese mit der Zellwand-Membran-Enzympräparation von *G. homari* können unter Verwendung radioaktiv markierter Zellwandvorstufen drei verschiedene Produkte bestimmt werden:

1.) das Gesamtmurein, das ist das gesamte synthetisierte Murein, das bei der Chromatographie (in Laufmittel A) immobil bleibt,

2.) das kovalent an die alte Zellwand gebundene Murein und

3.) das in Detergens lösliche Murein, das sich aus der Differenz von Gesamtmurein und wandgebundenem Murein ergibt.

Das lösliche Murein ist ein lineares Polymer, das noch nicht an die vorhandene Zellwand quervernetzt ist und deshalb in Natrium-Dodecylsulfatlösung löslich ist. Wie von Hammes (1976) gezeigt, stellt es ein Artefakt der *in vitro* Mureinsynthese dar.

3.1.2.1. Kinetik der Mureinsynthese aus unterschiedlich radioaktiv markierten UDP-MurNAc-Pentapeptiden oder UDP-MurNAc-Tetrapeptiden

Für die Untersuchungen der Kinetik der Mureinsynthese wurde der Einbau von radioaktiv markierten MurNAc-Peptiden in das Murein unter Verwendung der in Tabelle 8 aufgeführten radioaktiv markierten Zellwandvorstufen über einen Zeitraum von 2lo min gemessen. Als Produkt der Reaktion wurden sowohl die Abspaltung von radioaktiv markierten D-Alanin, als auch die Synthese von Gesamtmurein und zellwandgebundenem Murein erfaßt. Der Anteil anlöslichem Murein wurde aus der Differenz von Gesamtmurein und zellwandgebundenem Murein berechnet. Die erhaltenen Kinetiken sind in Abb.6 A-E graphisch dargestellt.

Tab.8: Verteilung der verschiedenen Peptiduntereinheiten in den Mureinfraktionen, synthetisiert aus UDP-MurNAc-pentapeptid oder UDP-MurNAc-tetrapeptid.

Substrat	Reaktionszeit	Lösliches Murein			Wandgebundenes Murein		
		Pentapeptid (%)	Tetrapeptid (%)	Tripeptid (%)	Pentapeptid (%)	Tetrapeptid (%)	Tripeptid (%)
UDP-MurNAc-pentapeptid	12o min	82	12	6	48	23	29
	21o min	69	25	6	48	23	29
UDP-MurNAc-tetrapeptid	12o min	0	82	18	0	63	37
	21o min	0	71	23	0	63	37

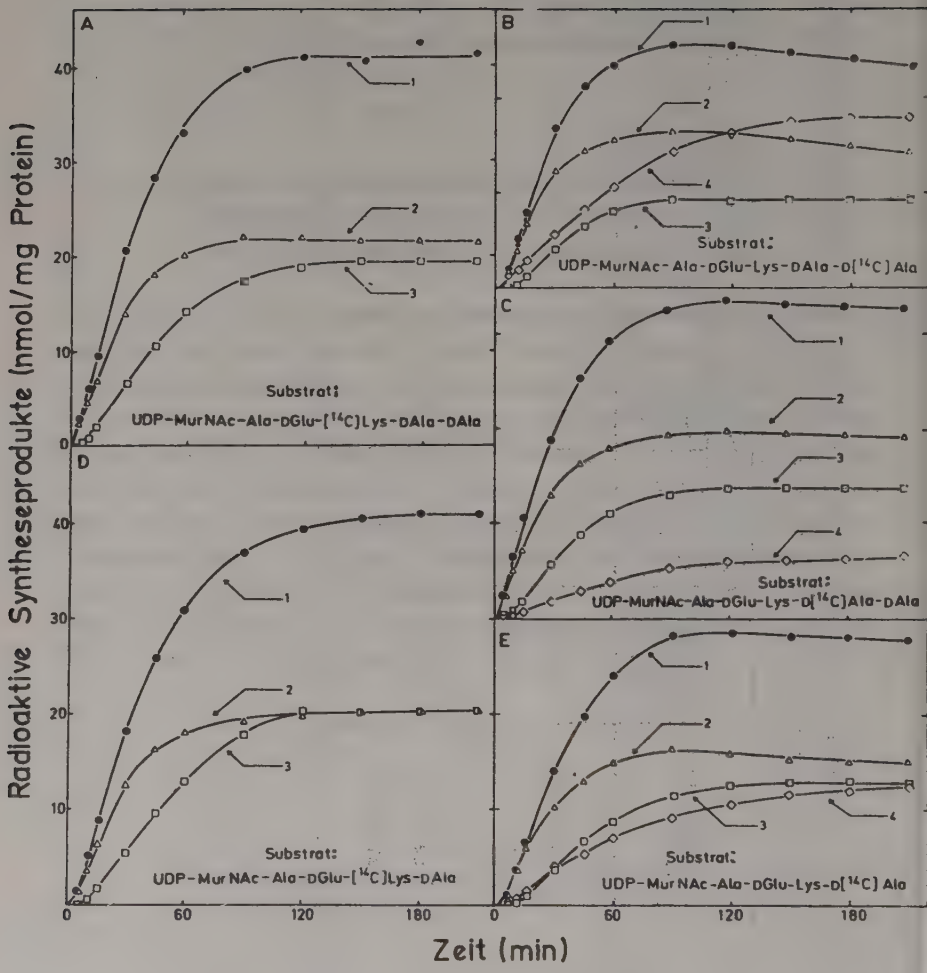


Abb.6:

Kinetik der Produktbildung aus unterschiedlich radioaktiv markierten Mureinvorstufen.

1: Gesamtmurein; 2: lösliches Murein;
3: wandgebundenes Murein; 4: abgespaltenes D-(^{14}C)Alanin.

3.1.2.2. Der Einbau von Tetra- und Tripeptidunterein-heiten in das Murein

Die Kinetiken des Einbaues von Tetra- und Tripeptidunter-einheiten (ermittelt durch Differenzbildung, siehe Tab.7), sind in Abb. 7 zusammengefaßt. Zusätzlich enthalten die Abbildungen 7 B und 7 C die Abspaltung von D-Alanin (Kurve 4) aus Position 4 der Peptiduntereinheit (über-nommen aus Abb. 6 C und 6 E). Da diese Abspaltung, wie im folgenden gezeigt wird, am naszierenden Peptidoglycan stattfindet, kann sie ebenfalls als Maß für die Bildung von Tripeptiduntereinheiten im Gesamtmurein angesehen werden. Wie die Abbildungen 7 B und 7 C zeigen, ist die Kinetik der Alaninabspaltung mit der Einbaukinetik von Tripeptid in das Gesamtmurein (Kurve 1) nahezu identisch; die D-Alaninabspaltung ist nur wenig geringer als der Tripeptideinbau. Da aber die D-Alaninabspaltung direkt gemessen wird, muß sie für signifikanter angesehen werden, als der aus der Differenzbildung ermittelte Tetrapeptid-einbau in das Gesamt-Murein (Kurve 1). Zur Bestimmung des Anteils an Tripeptiduntereinheiten im löslichen Murein wird deshalb die Differenz aus den Kinetiken 4 und 3 gebildet und als Kurve 2 b dargestellt; Kurve 2a zeigt die Differenz der Kurven 1 und 3.

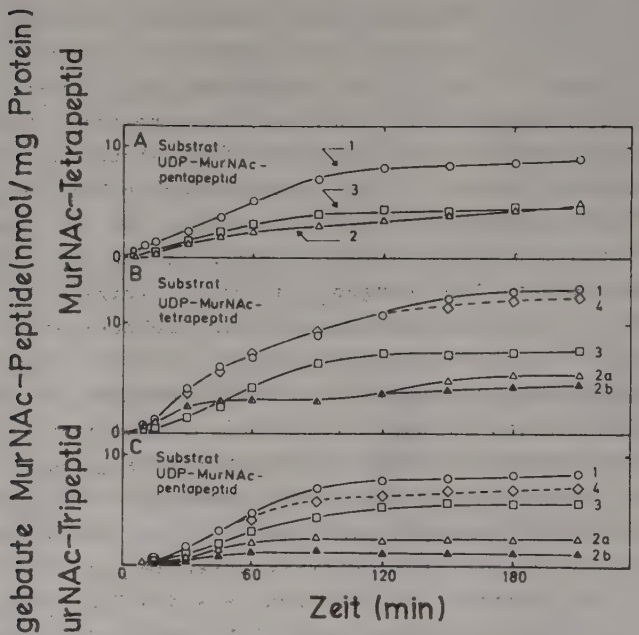


Abb.7:

Tetrapeptid- und Tripeptidanteil im neu synthetisierten Murein, gebildet mit den Zellwandvorstufen UDP-MurNAc-(^{14}C)Pentapeptid bzw. UDP-MurNAc-(^{14}C)Tetrapeptid.

1: Gesamtmurein; 2: lösliches Murein;
3: wandgebundenes Murein; 4: abgespaltenes D-(^{14}C)Alanin

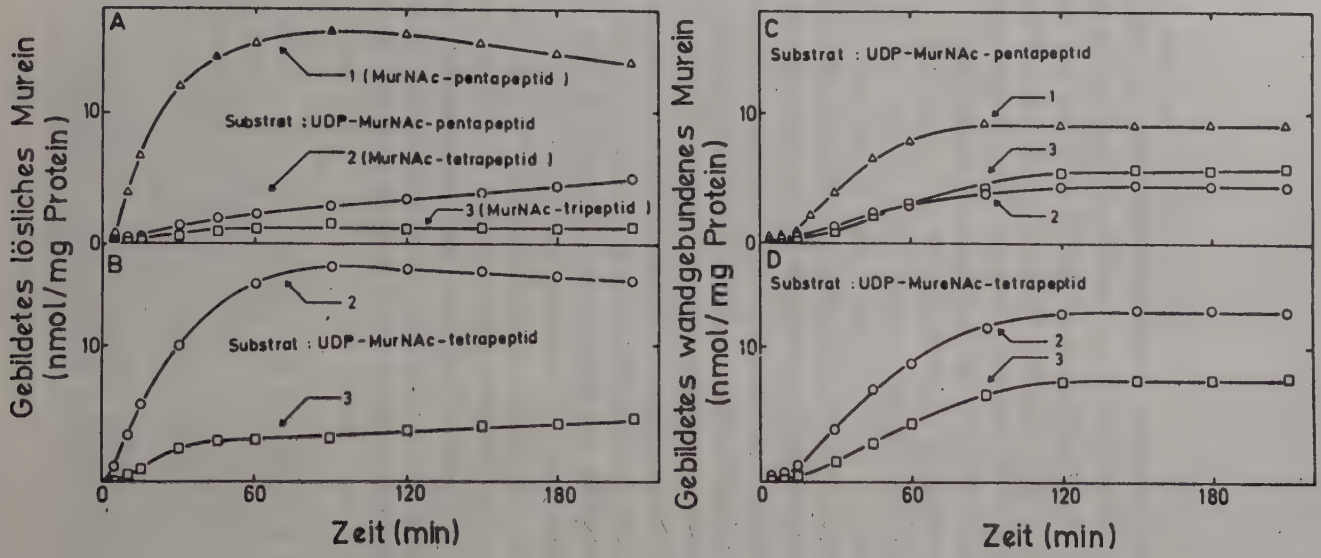


Abb.8:

Einbau der verschiedenen Peptiduntereinheiten in das lösliche Murein (A, C) und das zellwandgebundene Murein (B, D).

3.1.2.3. Kinetik des Einbaues von Penta-, Tetra- und Tripeptiduntereinheiten in das Murein

In Abb.8 sind diejenigen Kinetiken aus den Abbildungen 6 und 7 zusammengestellt, die den Einbau der 3 verschiedenen Peptiduntereinheiten in das lösliche oder zellwandgebundene Murein darstellen. Die Kurve 1 in Abbildung 8 A zeigt, daß das Substrat (4o nmol) bereits nach 12o min vollständig in das Murein eingebaut ist. Zu diesem Zeitpunkt ergibt sich mit UDP-MurNAc-Pentapeptid als Substrat eine prozentuale Verteilung von Pentapeptid, Tetrapeptid- und Tripeptiduntereinheiten im löslichen Murein von 82 : 12 : 6 (Tabelle 8, Abbildung 8 A). In dem Zeitraum zwischen 12o min und 21o min werden Pentapeptiduntereinheiten weiter zu Tetrapeptiden abgebaut, und so ergibt sich nach einer Inkubationsdauer von 21o min eine prozentuale Verteilung der Peptiduntereinheiten von 69 : 25 : 6. Diese Ergebnisse zeigen, daß das lösliche Murein ein relativ schlechtes Substrat für die DD-Carboxypeptidase(n) ist. Andererseits ist das zellwandgebundene Murein weder ein Substrat für die DD-Carboxypeptidase(n) noch für die LD-Carboxypeptidase(n), denn die prozentuale Verteilung der 3 Peptiduntereinheiten im zellwandgebundenen Murein bleibt in dem Zeitraum von 12o min bis 21o min konstant 48 : 23 : 29.

Das neu synthetisierte Murein aus dem Substrat UDP-MurNAc-Tetrapeptid enthält ausschließlich Tetrapeptid- und Tripeptiduntereinheiten. Wie Abb. 8 B zeigt, ist die prozentuale Verteilung der beiden Peptiduntereinheiten im löslichen Murein nach 12o min 82 : 18 (Tabelle 8) und verändert sich nach 21o min zu einem Wert von 71 : 23. Daraus kann man ebenfalls schließen, daß das lösliche Murein ein schlechtes Substrat für die LD-Carboxypeptidase(n) darstellt.

Im zellwandgebundenen Murein bleibt während des Zeitraumes von 12o min bis 21o min das Verhältnis der Peptiduntereinheiten konstant 63 : 37 (Tabelle 8). Die LD-Carboxypeptidase(n) hat deshalb auch hier keine Affinität zum zellwandgebundenen Murein. Das bestätigt somit auch das Ergebnis mit UDP-MurNAc-Pentapeptid als Vorstufe, wo ebenfalls die LD-Carboxypeptidase(n) am zellwandgebundenen Murein nicht angreifen konnte.

3.1.3. Die Abspaltung von D-Alanin aus den verschiedenen Peptiduntereinheiten bei ablaufender und nicht gleichzeitig stattfindender Mureinsynthese

In den Untersuchungen anderer Autoren (Blumberg and Strominger, 1971; Dusart et al. 1973) wurde gewöhnlich die Abspaltung von D-Alanin aus Position 5 von der nukleotidaktivierten Mureinvorstufe UDP-MurNAc-Pentapeptid als ein Maß der DD-Carboxypeptidaseaktivität angesehen. Der Überschuß an Alaninabspaltung aus derselben Vorstufe in zusätzlicher Gegenwart von UDP-GlcNAc wurde der Aktivität der Transpeptidase zugeschrieben. Diese Bestimmungsmethoden der Enzymaktivitäten können dann zu falschen Ergebnissen führen, wenn man annimmt, daß die DD-Carboxypeptidaseaktivität nicht oder nicht vollständig auf diese Weise erfaßt werden kann, d.h. wenn die DD-Carboxypeptidase an einem, bei der Synthese auftretendem Zwischenprodukt ausschließliche (bzw. zusätzliche) Aktivität aufweist. Damit dieser Fehler in meinen Untersuchungen vermieden werden konnte, bestimmte ich die Abspaltung von D-Alanin aus Position 4 bzw. 5 der Peptiduntereinheit (das Maß der LD- bzw. DD-Carboxypeptidaseaktivität) bei ablaufender bzw. nicht stattfindender Mureinsynthese. Praktisch unterscheiden sich die beiden Untersuchungen allein dadurch, daß die Alaninabspaltung aus

Standardinkubationsansätzen mit bzw. ohne UDP-GlcNAc gemessen wurde. Für diese Untersuchungen war die Präparation von G. homari in hervorragender Weise geeignet, da, wegen der einseitig ablaufenden Richtung der Transpeptidierungsreaktion (siehe Einleitung) kein radioaktiv markiertes D-Alanin aus der Transpeptidierung freigesetzt wird, welches das Ergebnis verfälschen könnte.

3.1.3.1. Alaninabspaltung in Abwesenheit von UDP-GlcNAc

In Abwesenheit von UDP-GlcNAc wurde die Abspaltung von D-Alanin aus Position 5 bzw. 4 aus der Vorstufe UDP-MurNAc-Pentapeptid bzw. UDP-MurNAc-Tetrapeptid bestimmt.

In Abb. 9 A sind die Kinetiken der Alaninabspaltung dargestellt. Man kann daraus erkennen, daß D-Alanin aus Position 4 weder aus dem Substrat UDP-MurNAc-Pentapeptid noch UDP-MurNAc-Tetrapeptid freigesetzt wird; d.h. die LD-Carboxypeptidase hat absolut keine Affinität zur nukleotidaktivierten Vorstufe.

Aus Position 5 wird andererseits D-Alanin abgespalten; die DD-Carboxypeptidase hat also eine Affinität zur nukleotidaktivierten Vorstufe. Zur Kontrolle wurde auch die D-Alaninabspaltung aus einem UDP-MurNAc-Pentapeptid gemessen, das sowohl in Position 4 als auch in Position 5 radioaktiv markiert war. Die Abspaltung von D-Alanin aus dieser Vorstufe war identisch mit derjenigen, die ausschließlich in Position 5 radioaktiv markiert war.

Dieses Ergebnis ist in Übereinstimmung mit dem Befund, daß die LD-Carboxypeptidase keine Aktivität zur nukleotidaktivierten Vorstufe hat (siehe oben).

3.1.3.2. Alaninabspaltung in Anwesenheit von UDP-GlcNAc

Die Kinetiken der D-Alaninabspaltung aus Position 4 und 5 wurden aus Abbildung 6 übernommen und in Abbildung 9 B zusammengefaßt. Zusätzlich wurde als Kontrolle die Alaninabspaltung aus UDP-MurNAc-Ala-DGlu-Lys-D(^{14}C)Ala-D(^{14}C)Ala bestimmt und in Abbildung 9 B eingeschlossen. Diese Kinetik ist identisch mit der Kurve der Summen des, während der Mureinsynthese abgespaltenen radioaktiven D-Alanins aus UDP-MurNAc-Ala-DGlu-Lys-DAla-D(^{14}C)Ala und UDP-MurNAc-Ala-DGlu-Lys-D(^{14})Ala-DAla. Bemerkenswert ist, daß die von einer DD-Carboxypeptidase katalysierte D-Alaninabspaltung aus Position 5 sofort mit Beginn der Inkubation erfolgt. Dagegen läßt sich eine Verzögerungsphase bei der D-Alaninabspaltung aus Position 4 erkennen, die identisch mit der Verzögerungsphase beim Einbau der Vorstufe in das zellwandgebundene Murein ist. Die Freisetzung von D-Alanin aus Position 4 ist mit UDP-MurNAc-Tetrapeptid rund zweimal so groß wie mit UDP-MurNAc-Pentapeptid.

Der Vergleich, der auf diese Weise ermittelten DD-Carboxypeptidase-Aktivität mit derjenigen, die in Abwesenheit von UDP-GlcNAc ermittelt wurde zeigt, daß UDP-GlcNAc eine 4,5-fache Steigerung der Abspaltung bewirkt.

Dieses Ergebnis deutet darauf hin, UDP-N-Acetylglucosamin könnte als Effektor auf die Carboxypeptidase(n) wirken und dadurch eine gesteigerte Hydrolyse der UDP-MurNAc-Peptide hervorrufen. Diese Möglichkeit konnte von Hammes (1978) in weiterführenden Untersuchungen widerlegt werden. Zu diesen Untersuchungen wurde das Zellwandantibiotikum Moenomycin (Flavomycin) verwendet, das die Polymerisation des Glycanstranges und zu einem geringeren Teil die Phospho-MurNAc-Pentapeptid-Translocase hemmt.

Bei vollständiger Hemmung der Mureinsynthese mit Moenomycin (800 µg/ml) waren die Abspaltungs-Kinetiken von radioaktiv markierten D-Alanin aus UDP-MurNAc-Ala-DGlu-Lys-D(^{14}C)Ala und aus UDP-MurNAc-Ala-DGlu-Lys-DAla-D(^{14}C)Ala identisch mit den Kinetiken, dargestellt in Abbildung 9 A. Durch dieses Ergebnis wird ein allosterischer Effekt von UDP-GlcNAc auf die Carboxypeptidasen widerlegt.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß sich die LD-Carboxypeptidaseaktivität allein bei ablaufender Mureinsynthese nachweisen läßt, während die DD-Carboxypeptidase unter diesen Bedingungen rund 4,5 mal aktiver ist als bei nicht ablaufender Mureinsynthese.

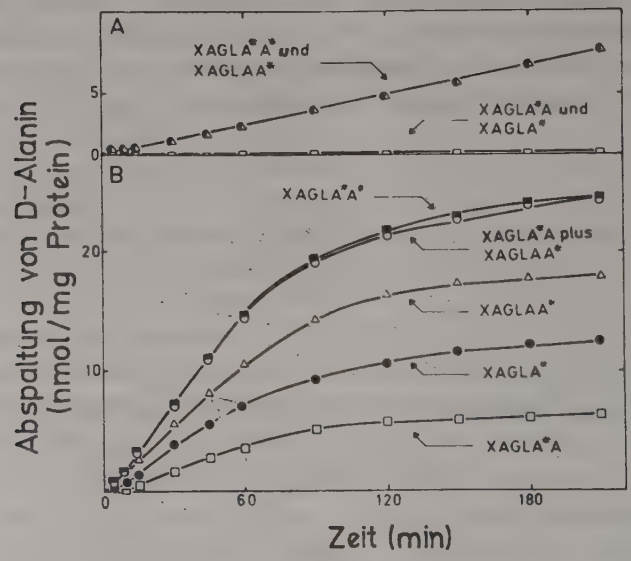


Abb.9:
Abspaltung von D(^{14}C)Alanin von UDP-MurNAc-(^{14}C)Pentapeptid und UDP-MurNAc-(^{14}C)Tetrapeptid im Standardreaktionsansatz I mit UDP-GlcNAc (B) und ohne UDP-GlcNAc (A).

3.2. Untersuchung der Wirkung von ß-Lactamantibiotika auf die Mureinsynthese aus UDP-MurNAc-Pentapeptid oder UDP-MurNAc-Tetrapeptid

Untersuchungen von Hammes (1976) haben gezeigt, daß die Synthese von wandgebundenem Murein äußerst empfindlich gegen Penicillin G ist. Zur Hemmung der Synthese aus UDP-MurNAc-Tetrapeptid müssen aber rund 2500-fach höhere Konzentrationen angewandt werden. Es wurde ferner gezeigt, daß der empfindliche Wirkungsort von Penicillin G die DD-Carboxypeptidase ist, während die Transpeptidase, die von anderen Autoren als der Wirkungsort (killing site) angesehen wird, zumindest weitgehend unempfindlich ist.

Es sollte nun geprüft werden, ob es unter der Vielzahl der ß-Lactamantibiotika auch solche gibt, die mit höherer Effizienz die Transpeptidierung bei G. homari hemmen können. Zu diesem Zweck wurden Konzentrationen an Antibiotika eingesetzt, die derjenigen entsprachen, die bei Penicillin G eine 25 %ige Hemmung des Einbaues von Murein aus UDP-MurNAc-Pentapeptid bzw. UDP-MurNAc-Tetrapeptid bewirkt hatte. Die Antibiotikakonzentration für die Hemmung des Einbaues von Pentapeptidvorstufen war 0.56 µmol/l und für die Hemmung des Einbaues von Tetrapeptidvorstufen 1.4 mmol/l. Das Versuchsergebnis ist in Tabelle 9 dargestellt.

Es wurde gefunden, daß Cephalosporin C und Carbenicillin Na^+ einen etwa doppelt so großen Hemmeffekt auf den Einbau von Tetrapeptidvorstufen in das zellwandgebundene Murein haben wie Penicillin G.

Tab.9: Untersuchung der Wirkung von ß-Lactamanantibiotika auf die Mureinsynthese aus UDP-MurNAc-Pentapeptid oder UDP-MurNAc-Tetrapeptid

Antibiotikum	Einbau von UDP-MurNAc-(^{14}C)Pentapeptid in		Einbau von UDP-MurNAc-(^{14}C)Tetrapeptid in	
	A (%)	B (%)	A (%)	B (%)
Penicillin G Na^+	1o6	77	1o5	78
Penicillin V K^+	1o1	72	1o1	88
6-Aminopenicillansäure	1o4	99	1o2	95
D-Penicillamin	1oo	1oo	1o6	94
Methicillin Na^+	1o8	1oo	1o1	1oo
Propicillin K^+	92	1oo	81	76
Ampicillin	1oo	87	1o2	92
Pivampicillin·HCl	91	99	78	75
Carbenicillin Na^+	99	93	72	48
Epicillin	1o2	92	1o2	79
Azidocillin Na^+	1o3	94	98	77
Oxacillin Na^+ H_2O	1o2	92	98	83
Flucloxacillin Na^+ · H_2O	1o5	93	88	61
Mecillinam·HCl·$2H_2O$	1o1	97	1o3	78
Cephalosporin C	1o5	99	1o4	48
Cefoxitin Na^+	1o4	58	1o2	93
Cephalotin Na^+	1o3	91	99	97
Cephalexin	1o5	94	1oo	1o2
Cephacetril Na^+	1o2	93	1o2	1o3
Cephaloridine	1o2	89	99	1o1
Cefazedon Na^+	92	91	84	1o2
Cephapirin Na^+	94	1o3	87	1o1
Cefazolin	92	1oo	85	1o2
Cephradine·H_2O	91	1o5	89	1o4
Cephaloglycin	128	93	1o4	97
α-Aminopimelinsäure	1o3	1oo	1o4	77
Hoe 7462oo	94	1oo	85	76
Hoe 415oo	92	91	86	55
Hoe 31466	91	85	84	87
EMD 29946	94	1o3	83	1o5

A = Gesamt-Murein
B = zellwandgebundenes Murein

Die Totalsynthese mit UDP-MurNAc-Ala-DGlu-(^{14}C)Lys-DAla als Substrat wird nur von Carbenicillin gehemmt. Somit ergibt sich mit diesem Antibiotikum ein für ß-Laktamantibiotika untypischer Effekt. Dagegen hemmt Cephalosporin C den Einbau von Tetrapeptidvorstufen in das zellwandgebundene Murein, während der Einbau von Pentapeptidvorstufen in das wandgebundene Murein, sowie der Einbau beider Peptidvorstufen in das Gesamtmurein ungehemmt bleiben. Dieses Antibiotikum erfüllt somit die Voraussetzungen für eine spezifische Hemmwirkung.

Genauere Untersuchungen sollen nun Aufschluß über die besondere Wirkungsweise von Cephalosporin C geben.

3.2.1. Untersuchung und Vergleich der Wirkung von Penicillin G und Cephalosporin C auf den Einbau von MurNAc-Pentapeptid in das Murein

Für die Untersuchung wird als radioaktiv markiertes Substrat UDP-MurNAc-Ala-DGlu-(^{14}C)Lys-DAla-DAla und UDP-MurNAc-Ala-DGlu-Lys-DAla-D(^{14}C)Ala verwendet. Unter Standardreaktionsbedingungen (Standardreaktionsansatz I) wird der Einfluß steigender Konzentrationen der beiden Antibiotika auf die Produktbildung untersucht.

3.2.1.1. Untersuchung der Hemmwirkung von Penicillin G auf die Synthese von Murein aus UDP-MurNAc-Pentapeptid

Die Untersuchung der Wirkung von Penicillin G auf die Mureinsynthese aus UDP-MurNAc-Pentapeptid bestätigt mit einer neu hergestellten Zellwand-Membran-Enzympräparation die schon früher erhaltenen Ergebnisse, die mit einer anderen Präparation erhalten worden waren.

Penicillin G hat keinen Effekt auf die Gesamtmureinsynthese (ohne Abbildung), hemmt aber deutlich die Synthese des zellwandgebundenen Mureins (ID_{5o} = 1.5 µmol/l). Die empfindlichste Reaktion ist aber die D-Alaninabspaltung aus Position 5 der Peptiduntereinheit. In Gegenwart von UDP-GlcNAc, d.h. bei gleichzeitig ablaufender Mureinsynthese ist die Alaninabspaltung bei einer Konzentration von o.7 µmol/l Penicillin G zu 5o % gehemmt. In Abwesenheit von UDP-GlcNAc, d.h. ohne gleichzeitiger Mureinsynthese, wird der selbe Hemmeffekt durch o.35 µmol/l erzielt. Die Hemmung der Abspaltung von D-Alanin aus Position 5, d.h. die Hemmung der DD-Carboxypeptidase führt zu einem vermehrten Einbau von MurNAc-Ala-DGlu-Lys-DAla-D(^{14}C)Ala in das Gesamtmurein (Abb. 1o A).

3.2.1.2. Untersuchung der Hemmwirkung von Cephalosporin C auf die Synthese von Murein aus UDP-MurNAc-Pentapeptid

Wie aus Abbildung 11 A ersehen werden kann, besitzt Cephalosporin C eine weit geringere Hemmwirkung auf die Synthese des zellwandgebundenen Mureins. Der Einbau von UDP-MurNAc-Pentapeptid wird erst bei einer Konzentration von o.29 mmol/l zu 5o % gehemmt. Qualitativ zeigt Cephalosporin C aber die gleiche Wirkung wie Penicillin G : die D-Alaninabspaltung ist wieder die empfindlichste Reaktion, sie wird in Gegenwart und in Abwesenheit von UDP-GlcNAc im gleichen Ausmaß gehemmt. Die Hemmung der DD-Carboxypeptidase bewirkt auch hier wieder den vermehrten Einbau an MurNAc-Ala-DGlu-Lys-DAla-D(^{14}C)Ala in das Gesamtmurein.

3.2.2. Untersuchung und Vergleich der Wirkung von Penicillin G und Cephalosporin C auf den Einbau von MurNAc-Tetrapeptid in das Murein

Zur Untersuchung der Hemmwirkung von Penicillin G und Cephalosporin C wird als radioaktiv markiertes Substrat UDP-MurNAc-Ala^1-D-Glu^2-(^{14}C)Lys^3-D-Ala^4 und UDP-MurNAc-Ala^1-D-Glu^2-Lys^3-D-(^{14}C)Ala^4 verwendet. Unter Standardreaktionsbedingungen (Standardreaktionsansatz II) werden steigende Antibiotikakonzentrationen auf ihre Hemmwirkung untersucht, und der Einbau der radioaktiv markierten Zellwandvorstufen in das Gesamtmurein und das wandgebundene Murein bestimmt. Durch die Verwendung von UDP-MurNAc-Ala-D-Glu-Lys-D-(^{14}C)Ala als Substrat für die Mureinsynthese, läßt sich auch das bei der Reaktion freigesetzte (^{14}C)Alanin bestimmen.

3.2.2.1. Untersuchung der Hemmwirkung von Penicillin G auf den Einbau von MurNAc-Tetrapeptid in das Murein

Abbildung 1o B zeigt, daß zur 5o %igen Hemmung des Einbaues von UDP-MurNAc-Tetrapeptid in die Zellwand eine Penicillin G-Konzentration von 3,1 mmol/l notwendig ist. Empfindlicher ist die D-Alaninabspaltung durch das Antibiotikum gehemmt. Eine 5o %ige Hemmung der LD-Carboxypeptidase wird schon bei 1 mmol/l Penicillin G erreicht. Als Folge der geringen D-Alaninabspaltung ergibt sich für den Isotopeneinbau in das Gesamtmurein ein Anstieg (Abbildung 1o B).

3.2.2.2. Untersuchung der Hemmwirkung von Cephalosporin C auf die Synthese von Murein aus UDP-MurNAc-Tetrapeptid

Wie aus Abbildung 11 B ersichtlich ist, wird die Synthese des wandgebundenen Mureins aus UDP-MurNAc-Tetrapeptid bei einer Konzentration von 1.3 mmol Cephalosporin C pro Liter zu 5o % gehemmt. Auffallend ist aber, daß die D-Alaninabspaltung aus Position 4 nicht gehemmt, sondern durch Cephalosporin C aktiviert ist. Als Folge der erhöhten D-Alaninfreisetzung tritt dann ein verringerter Isotopeneinbau in das Gesamtmurein auf.

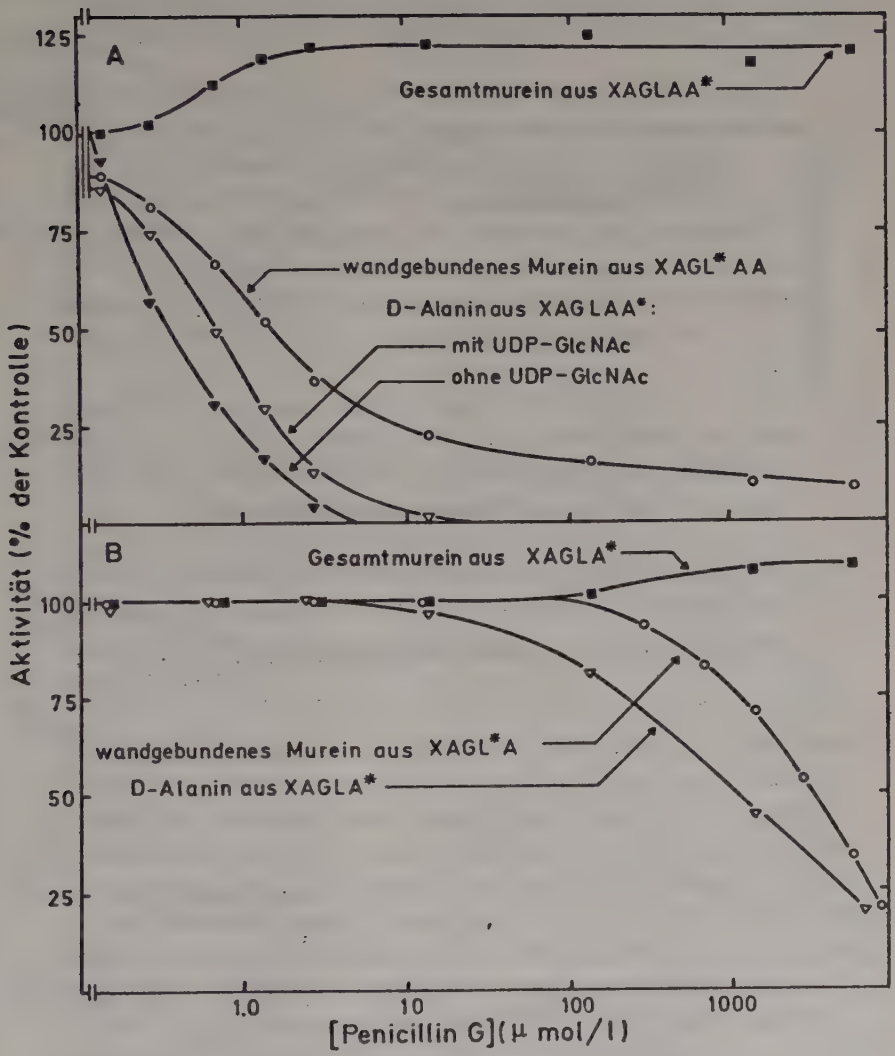


Abb.1o:

Wirkung von Penicillin G auf die Produktbildung aus UDP-MurNAc-Pentapeptid (A) oder UDP-MurNAc-Tetrapeptid (B)

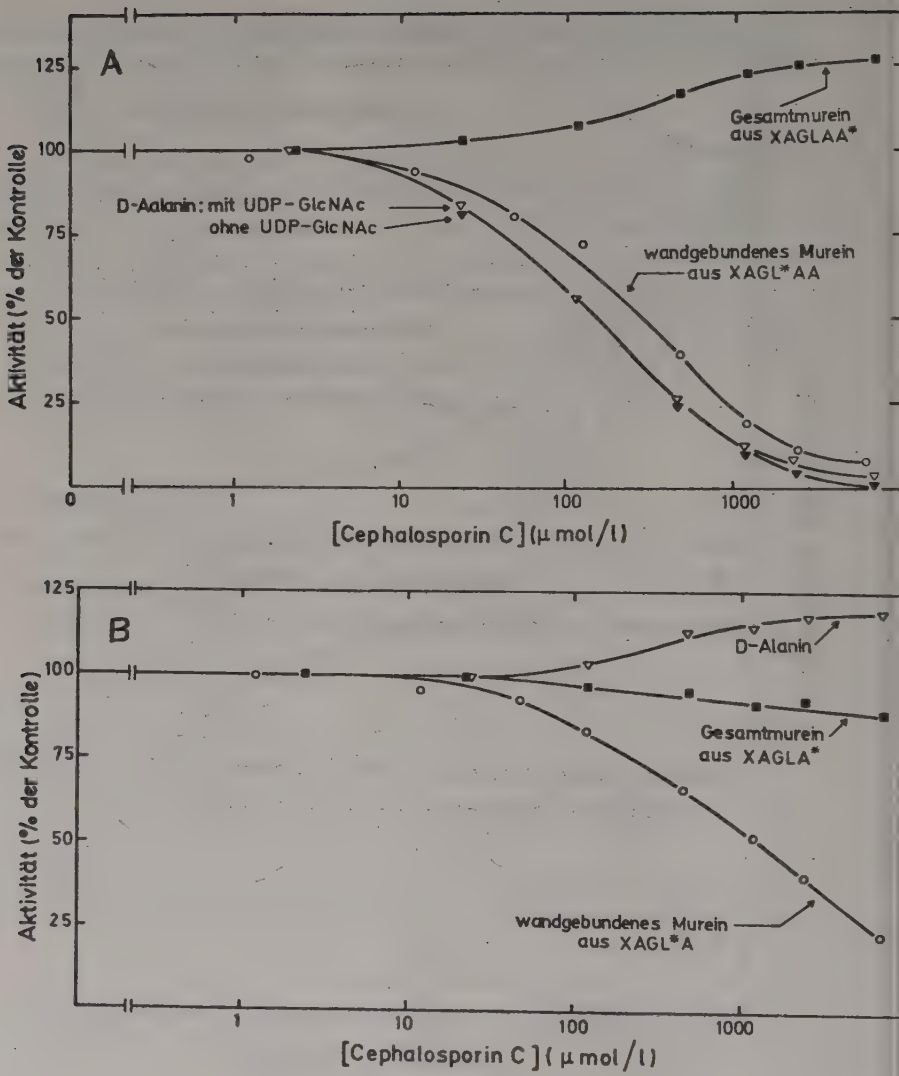


Abb.11:

Wirkung von Cephalosporin C auf die Produktbildung aus UDP-MurNAc-Pentapeptid (A) oder UDP-MurNAc-Tetrapeptid (B)

3.3. Die Wirkung der Peptidantibiotika Nisin und Subtilin auf die in vitro Mureinsynthese

Linnett und Strominger (1973) hatten gefunden, daß die durch Nisin und Subtilin verursachte Wachstumshemmung mit einer Hemmung der Mureinsynthese verbunden ist. Bei diesen Untersuchungen mit Enzympräparationen aus E. coli wurde die Produktbildung durch Messen des Einbaues von radioaktiv markiertem N-Acetylglucosamin in das Murein bestimmt. Es wurde beobachtet, daß die Mureinsynthese durch diese Antibiotika empfindlich gehemmt war.

Mit Nisin erfolgte dabei keine Anreicherung von radioaktiv markiertem GlcNAc-MurNAc-(Pentapeptid)-P-P-Lipid mehr. Andererseits wurde diese Mureinvorstufe mit Subtilin deutlich angereichert. Dieses Ergebnis legt nun nahe, daß im Falle von Nisin entweder die Phospho-N-acetyl-muramyl-Pentapeptid-Translokase oder die Trans-N-acetyl-glycosylase gehemmt ist, während Subtilin allein die durch die Peptidoglycan-Synthetase katalysierte Reaktion gehemmt wird.

Diese Interpretation ist erstaunlich, denn, wie Abbildungen unter 2.2.4. zeigen, haben die beiden Antibiotika sehr ähnliche Strukturen und deshalb würde man gleiche Wirkungsweise vermuten. Um den Wirkungsort von Nisin genauer zu bestimmen und um ihn mit dem des strukturähnlichen Subtilin zu vergleichen, wurde der Einfluß beider Antibiotika auf die in vitro Mureinsynthese untersucht. Hierfür wurden die Standardreaktionsansätze I (radioaktiv markiertes Substrat : UDP-MurNAc-Ala-DGlu-(^{14}C)Lys-DAla-DAla) und II (radioaktiv markiertes Substrat : UDP-(^{14}C)N-Acetylglukosamin) verwendet. Zunächst wurde die Antibiotikaempfindlichkeit von G. homari, dem Organismus, aus dem auch die Enzympräparationen bereitet wurden, bestimmt. Im Reihenverdünnungstest wurde eine minimale Hemmkonzentration von o.2 µg/ml Nisin ermittelt.

3.3.1. Untersuchung der Wirkung der Antibiotika Nisin und Subtilin auf die Mureinsynthese aus UDP-MurNAc-Ala-DGlu-(^{14}C)Lys-DAla-DAla und UDP-GlcNAc

Standardreaktionsansätze (I) wurden in Gegenwart von steigenden Antibiotikakonzentrationen ausgeführt. Die Bildung d Gesamt-Mureins, des zellwandgebundenen Mureins, und des Lip zwischenproduktes wurden gemessen und in Abhängigkeit von d Antibiotikakonzentration graphisch dargestellt (Abb.12 und

Für beide Antibiotika ergaben sich qualitativ gleiche Effek bei niedrigen Konzentrationen waren sowohl die Gesamtsynthe als auch die Synthese von wandgebundenem Murein aktiviert; hohen Antibiotikakonzentrationen wurde schließlich eine Hemmung der Polymersynthese beobachtet. Beide Antibiotika verursachten auch eine konzentrationsabhängige Anreicherung eines lipidaktivierten Zwischenproduktes, dessen Maximum bei vollständiger Hemmung der Mureinsynthese erreicht wird. Die Wirkung von Nisin auf die Mureinsynthese war stärker als diejenige von Subtilin, sowohl im niedrigen Konzentrationsbereich, in dem es die Bildung des Gesamt-Mureins bzw. des zellwandgebundenen Mureins um 13 % bzw. 23 % aktiviert als auch im höheren, in dem eine 5o %ige Hemmung mit 57 µg/ml bzw. 6o µg/ml gefunden wurde (Tab.1o). Bei Subtilin dagegen betrug die Aktivierung im niederen Konzentrationsbereich nur 5 % bzw. 4 %; eine 5o %ige Hemmung der Mureinsynthesen wurden erst mit 17o µg/ml erreicht (Tab.1o). Für beide Antibiotika ergab sich übereinstimmend eine Anreicherung des Lipidzwischenproduktes auf rund 3oo % bei praktisch vollständiger Hemmung der Gesamt-Mureinsynthese. Darüberhinaus ist eine 5o %ige Hemmung sowohl für Nisin al auch für Subtilin mit der gleichen Anreicherung des Lipidzwischenproduktes auf rund 25o % verbunden (Tab.11). Diese Ergebnis legt nahe, daß die Phospho-MurNAc-Pentapeptid-Translokase durch diese Antibiotika nicht gehemmt sein kan Für Nisin wird das zusätzlich durch Messen der Antibiotikawirkung auf die Transferreaktion (3.3.6.2.) voll bestätigt

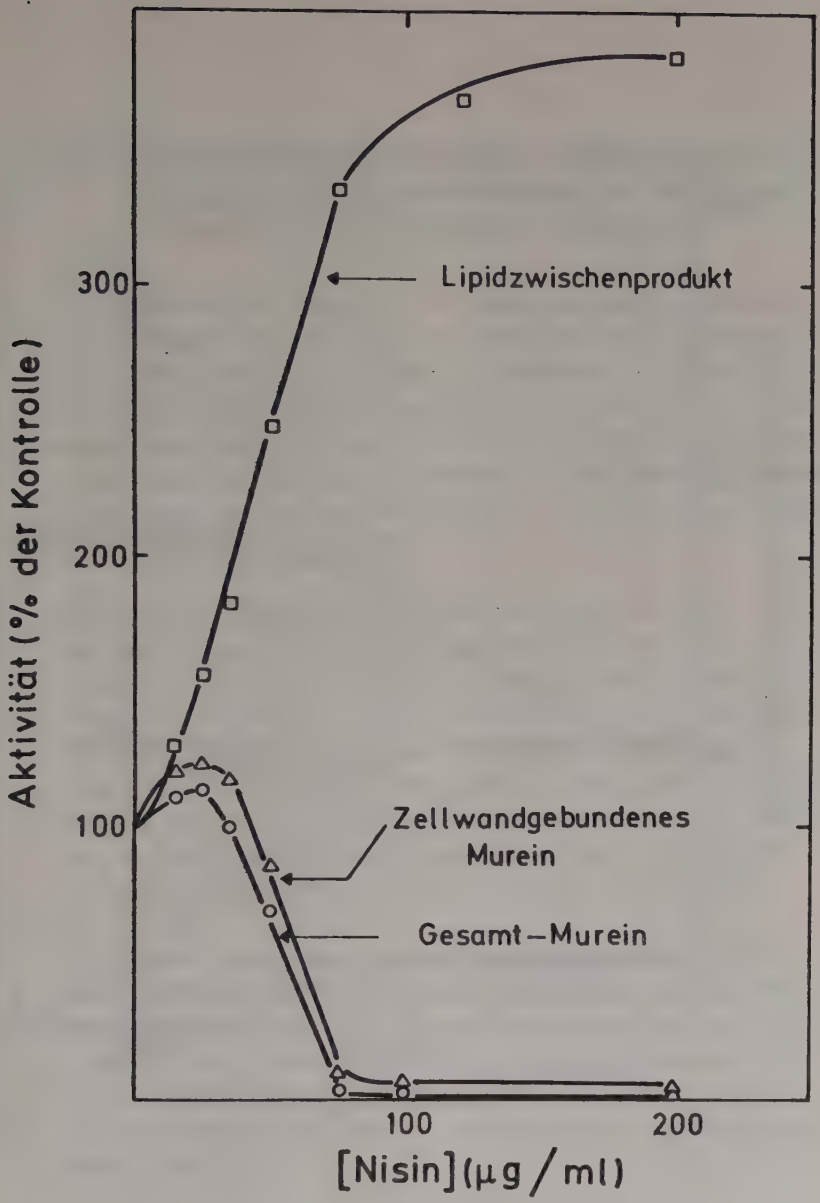


Abb.12:

Wirkung des Antibiotikums Nisin auf die Mureinsynthese aus UDP-MurNAc-Ala-DGlu-(^{14}C)Lys-DAla-DAla und UDP-GlcNAc

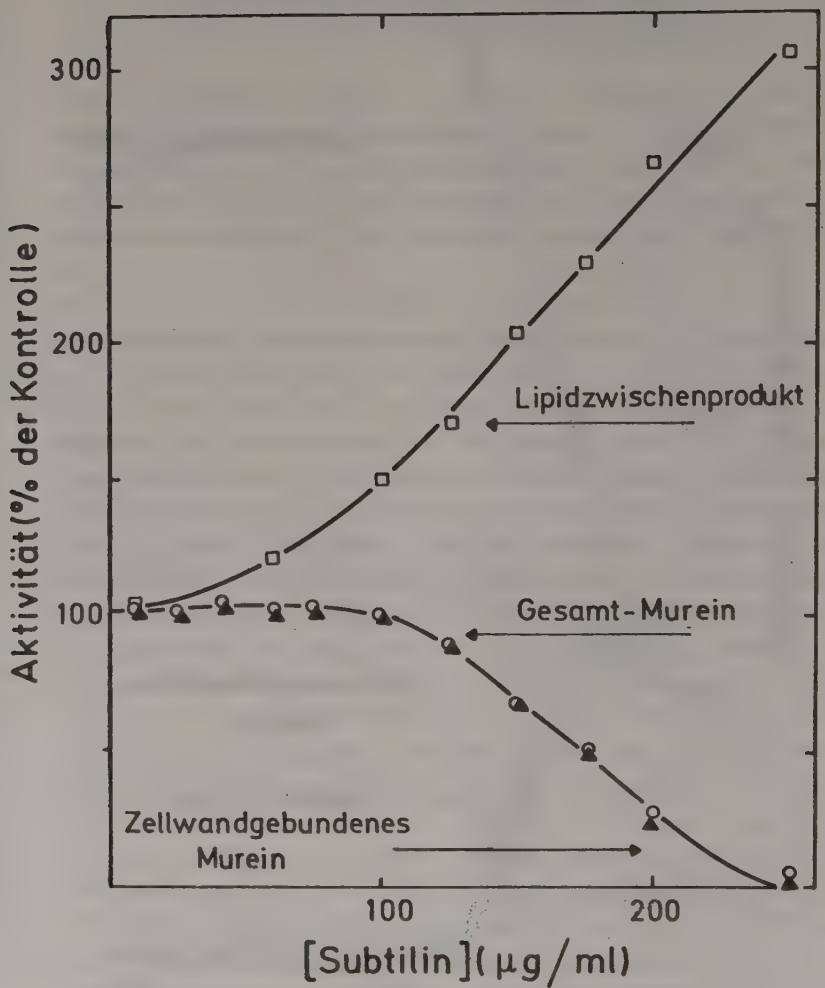


Abb.13:

Wirkung des Antibiotikums Subtilin auf die Mureinsynthese aus UDP-MurNAc-Ala-DGlu-(^{14}C)Lys-DAla-DAla und UDP-GlcNAc

3.3.2. Untersuchung der Wirkung der Antibiotika Nisin und Subtilin auf die Mureinsynthese aus UDP-MurNAc-Ala-DGlu-Lys-DAla-DAla und UDP-(^{14}C)GlcNAc

Standardreaktionsansätze, in denen die Mureinsynthese durch Messen des Einbaues von radioaktivem N-acetylglucosamin gemessen wurde (II), wurden in Gegenwart von steigenden Antibiotikakonzentrationen ausgeführt. Die Bildung des Gesamtmureins, des wandgebundenen Mureins und des Lipidzwischenproduktes (C_{55}-P-P-MurNAc-Pentapeptid-(^{14}C)GlcNAc) wurde gemessen und in Abhängigkeit von der Antibiotikakonzentration dargestellt (Abb. 14 und 15).

Wie aus Abbildung 14 und 15 ersichtlich ist, wird auch der Einbau von (^{14}C)GlcNAc aus UDP-(^{14}C)GlcNAc in das Gesamtmurein und in das wandgebundene Murein durch Nisin und Subtilin gehemmt. Die Wirkung von Nisin war auch hier stärker. Eine 5o %ige Hemmung der Gesamtmureinsynthese wird mit 57 µg Nisin pro ml bzw. 165 µg Subtilin pro ml erreicht. Die entsprechenden ID_{5o}-Werte für das zellwandgebundene Murein betrug 6o µg/ml bzw. 165 µg/ml. Diese Werte sind in Tabelle 1o aufgeführt.

Es ist wiederum bemerkenswert, daß im niedrigen Konzentrationsbereich eine signifikante Aktivierung der Mureinsynthese auftritt. Diese beträgt bei einer Nisinkonzentration von 3o µg/ml für das wandgebundene Murein 23 % und für das Gesamtmurein 5 %. Bei Subtilin dagegen war die Aktivierung nur im wandgebundenen Murein meßbar und betrug 5 %.

Ein Vergleich des Einflusses der beiden Antibiotika auf die Synthese von unterschiedlich markiertem Murein (Tab. 1o) zeigt an, daß der Hemmeffekt von der Markierung unabhängig ist.

Ein gravierender Unterschied der beiden Antibiotika zeigt sich aber in der Anreicherung des Lipidzwischenproduktes. Mit Subtilin (Abb.15) findet man wiederum Lipidanreicherungen auf ca. 28o bzw. 3oo % bei 5o bzw. 1oo %iger Hemmung der Mureinsynthese. Ein anderes Bild ergibt sich aber für Nisin (Abb.14). Hier wurde bei 5o %iger und praktisch 1oo %iger Hemmung der Mureinsynthese gleiche Lipidanreicherung auf nur rund 15o % gemessen. Nisinkonzentrationen die über den Bereich hinausgehen, die die Mureinsynthese gerade zu 1oo % hemmen, führen zu einer kontinuierlich abnehmenden Anreicherung von (^{14}C)GlcNAc-MurNAc(-Pentapeptid)-P-P-Lipid.

Dieser Unterschied der beiden Antibiotika in der Anreicherung eines Lipidzwischenproduktes (Tab.11) weist darauf hin, daß trotz Strukturähnlichkeit der beiden Antibiotika Unterschiede in ihrem Wirkungsort aufweisen. Nisin hat offenbar im Unterschied zu Subtilin bei hohen Konzentrationen auch einen Hemmeffekt auf die Synthese von GlcNAc-MurNAc(Pentapeptid)-P-P-Lipid.

Tab.1o: ID_{50}-Werte (µg/ml) von Nisin und Subtilin für die Hemmung der Synthese von Gesamtmurein und wandgebundenem Murein aus den entsprechenden Substraten.

Antibiotikum	ID_{50}-Konzentrationen (µg/ml)			
	radioaktiv markiertes Substrat: UDP-MurNAc-(^{14}C)Pentapeptid		radioaktiv markiertes Substrat: UDP-(^{14}C)GlcNAc	
	Gesamtmurein	zellwandgebundenes Murein	Gesamtmurein	zellwandgebundenes Murein
Nisin	57	6o	57	6o
Subtilin	17o	17o	165	165

Tab.11: Anreicherung des Lipidzwischenproduktes mit Nisin und Subtilin

Antibiotikum	Hemmung der Mureinsynthese (in %)	Anreicherung des Lipidzwischenproduktes (% der Kontrolle) unter Verwendung folgender radioaktiv markierter Substrate:	
		UDP-MurNAc-(^{14}C)Pentapeptid	UDP-(^{14}C)GlcNAc
Nisin	5o	25o	146
	1oo	3oo	157
Subtilin	5o	25o	28o
	1oo	3oo	3oo

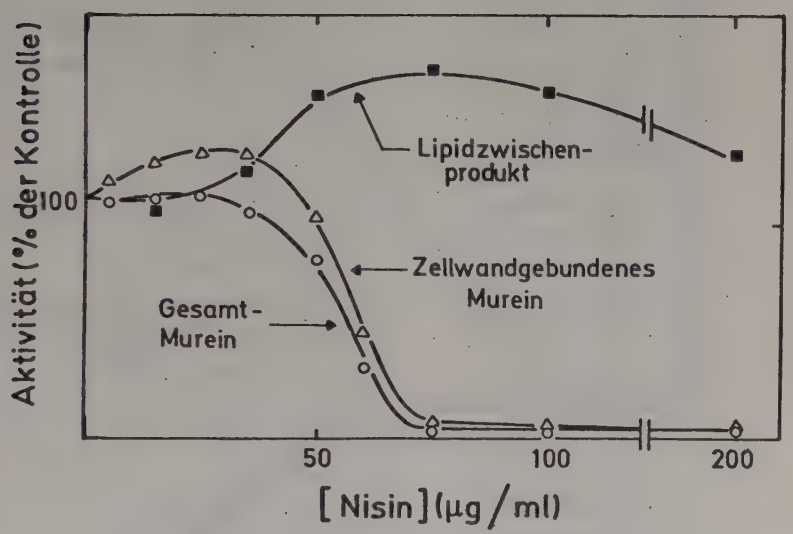


Abb.14:

Wirkung des Antibiotikums Nisin auf die Mureinsynthese aus UDP-MurNAc-Ala-DGlu-Lys-DAla-DAla und UDP-(^{14}C)GlcNAc

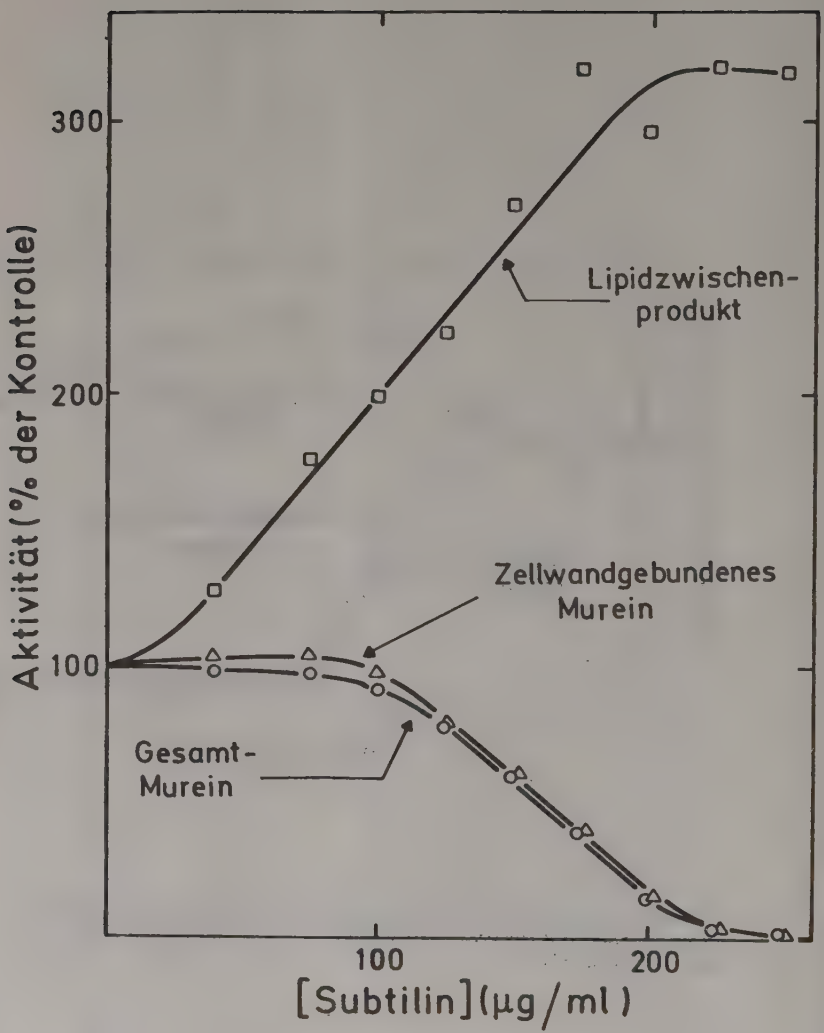


Abb.15:

Wirkung des Antibiotikums Subtilin auf die Mureinsynthese aus UDP-MurNAc-Ala-DGlu-Lys-DAla-DAla und UDP-(^{14}C)GlcNAc

3.3.3. Komplexbildung von Nisin oder Subtilin mit Zwischenprodukten der Mureinsynthese

Die Untersuchung des Hemmeffektes von Nisin ließ erkennen, daß die Gesamtmureinsynthese zu 100 %, die Synthese des wandgebundenen Mureins aber nur zu 95 % hemmbar war (Abb.12). Diese Beobachtung ist erstaunlich, denn das Gesamtmurein enthält ja das zellwandgebundene Murein und sollte daher ebenfalls nicht vollständig hemmbar sein. Eine Erklärung für diese Beobachtung bietet die Annahme, daß während der Inkubation ein Produkt gebildet wird, das sich nicht durch Waschen mit 2 %iger Natriumdodecylsulfat-Lösung von den Zellwänden entfernen läßt, sich aber während der Chromatographie in Laufmittel A vollständig vom Gesamtmurein am Ursprung abtrennt. Diese Annahme wurde geprüft und für zutreffend befunden. Nach der Chromatographie des mit 2 %iger Natriumdodecylsulfat-Lösung gewaschenen Produktes (synthetisiert im Standardreaktionsansatz I mit 250 µg Nisin/ml) konnte am Ursprung des Chromatogrammes keine Radioaktivität mehr gemessen werden. Die gesamte Aktivität wurde dafür in der Position des Lipidzwischenproduktes (R_f = 0.75) nachgewiesen. Dieses Ergebnis zeigt, daß mit Nisin unter Mureinsynthesebedingungen ein Komplex entsteht, der durch Waschen mit 2 %iger Natriumdodecylsulfat-Lösung nicht von den Zellwänden entfernt werden kann, der aber bei Chromatographie in Laufmittel A dissoziiert. Da durch Nisin der Einbau von N-Acetylglucosamin in die lipidaktivierte Vorstufe

gehemmt wird, wurde angenommen, daß der Komplex auch ohne UDP-N-Acetylglukosamin gebildet wird. Dazu wurde der Versuch (Standardreaktionsansatz I mit 25o µg/ml Nisin) wiederholt und der Komplex in Gegenwart und Abwesenheit von UDP-N-Acetylglukosamin bestimmt. In Übereinstimmung mit der Annahme ergab der Versuch keinen Unterschied im Einbau von radioaktiver Markierung. Er betrug 12o pmol lipidaktivierter Vorstufe und das entspricht 15 % des Einbaues der Zellwandvorstufe in das wandgebundene Murein bei ungehemmter Mureinsynthese. Daraus kann geschlossen werden, daß für die Komplexbildung mit Nisin allein die Vorstufe UDP-MurNAc-Pentapeptid notwendig ist; UDP-GlcNAc wird dagegen nicht benötigt.

3.3.3.1. Abhängigkeit der Komplexbildung von der Antibiotikakonzentration

Zur Bestimmung der Abhängigkeit der Komplexbildung von der Konzentration der Antibiotika Nisin und Subtilin wurde der Gehalt an lipidaktivierter Vorstufe im detergensgewaschenen Reaktionsprodukt (Standardreaktionsansatz III) gemessen und in Abbildung 16 graphisch dargestellt.

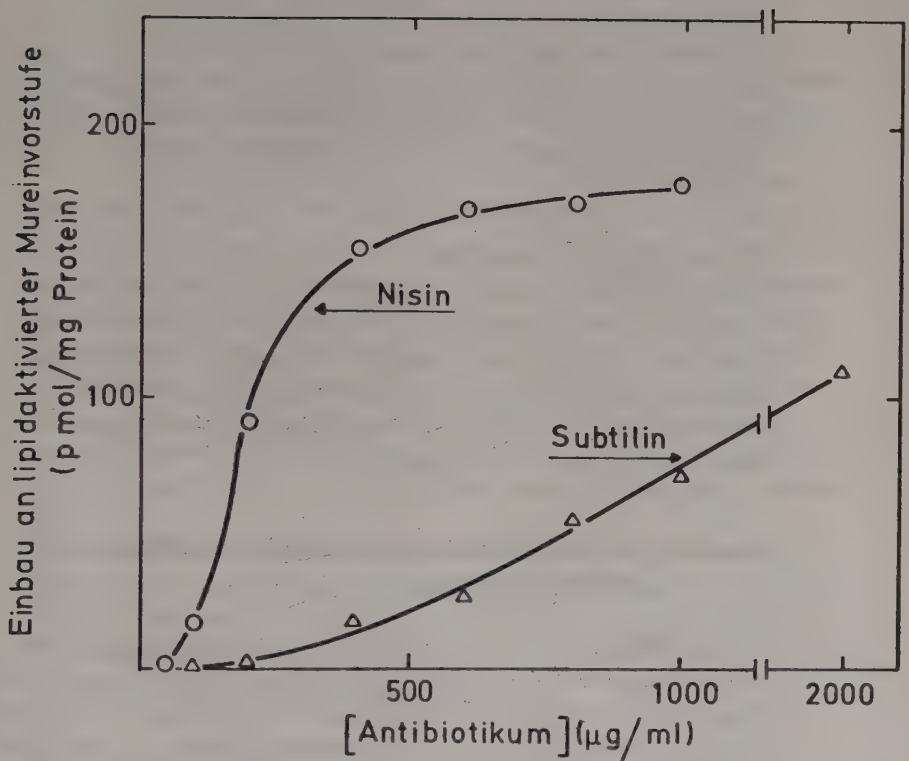


Abb.16:
Abhängigkeit der Komplexbildung von der Antibiotikakonzentration

Abbildung 16 zeigt, daß bei einer Nisinkonzentration von loo µg/ml 17 pmol MurNAc-(^{14}C)-peptid in den Komplex eingebaut werden. Bei der entsprechenden Subtilinkonzen-

tration von 25o µg/ml befinden sich dagegen nur 5 pmol der Vorstufe im Komplex. Mit steigender Antibiotikakonzentration vergrößert sich die Komplexbildung bei Nisin sehr stark (156 pmol bei 4oo µg/ml) bis bei 175 pmol eine Sättigung eintritt. Mit Subtilin erfolgt dagegen nur ein sehr langsamer Anstieg der Komplexbildung, so daß erst bei einer Konzentration von 2,o mg/ml 11o pmol Vorstufe im Komplex gefunden werden.

Daraus kann man entnehmen, daß die Komplexbildung abhängig von der Antibiotikakonzentration ist. Ob die Antibiotika Nisin und Subtilin tatsächlich selbst am Komplex beteiligt sind, konnte allerdings durch diese Versuche nicht geklärt werden, weil dazu radioaktiv markierte Antibiotika notwendig gewesen wären, die aber leider nicht verfügbar sind.

3.3.3.2. Komplexbildung mit weiteren lipidaktivierten MurNAc-Peptiden

Um die Möglichkeit zu untersuchen, ob auch andere UDP-aktivierte Mureinvorstufen einen Komplex mit Nisin bilden, wurden UDP-MurNAc-Tripeptid, UDP-MurNAc-Tetrapeptid und ein in Position 3 der Peptiduntereinheit acetyliertes UDP-MurNAc-Pentapeptid auf die Komplexbildung hin untersucht (Standardreaktionsansatz III). Die Versuche ergaben, daß, in Gegenwart von 25o µg/ml Nisin, von allen drei verwendeten Mureinvorstufen ca. 1oo pmol in den Komplex eingebaut wurden. Damit unterscheidet sich Nisin wesentlich von dem Antibiotikum Vancomycin, das nur mit Peptiden, die eine endständige D-Alanyl-D-Alanin-Gruppe aufweisen, komplexiert.

3.3.4. Untersuchung des Hemmeffektes von Nisin und Subtilin auf die in vitro Mureinsynthese mit dem Membran-Enzym aus G. homari

Die bisherigen Untersuchungen zeigten, daß auch in Gegenwart von Nisin Lipidzwischenstufen gebildet werden, die Polymerisation dieser Vorstufen und ihr späterer Einbau in die vorgefertigte Zellwand aber gehemmt sind. Der frühe Wirkungsort des Nisins in der Mureinbiosynthese ermöglicht es, für die folgenden Untersuchungen den einfacheren, von Hammes und Neuhaus (1974) beschriebenen Membran-Enzymkomplex aus G. homari zu verwenden. Dieses Enzym zeichnet sich dadurch aus, daß es eine hohe Aktivität zur Synthese von nicht vernetztem Murein besitzt und wegen des Fehlens der Transpeptidierung weniger komplex ist. Außerdem können die Untersuchungen mit wesentlich geringerem Arbeitsaufwand durchgeführt werden.

Für die Testansätze wurden die von Hammes und Neuhaus (1974) beschriebenen Bedingungen gewählt und in Vorversuchen bestätigt, daß auch mit der hier verwendeten Enzympräparation die Mureinsynthese linear vom Proteingehalt und der Zeit abhängig ist.

3.3.4.1. Hemmung der durch die Membran-Enzympräparation aus G.homari katalysierten in vitro Mureinsynthese durch Nisin

Die Konzentrationsabhängigkeit der Hemmung der durch die Membran-Enzympräparation katalysierten in vitro Mureinsynthese mit Nisin wurde wie im Standardreaktionsansatz I beschrieben untersucht (Abb.17). Der hier ermittelte ID_{50}-Wert entspricht demjenigen, der für die Synthese mit dem Zellwandmembran-Enzym bestimmt wurde (Tab.1o).

Erstaunlicherweise zeigt die Hemmung der Synthese eine weitgehend lineare Abhängigkeit von der Nisinkonzentration. Es wurde also keine derartige Aktivierung der Mureinsynthese im niedrigen Konzentrationsbereich festgestellt, wie sie mit dem Zellwandmembran-Enzym zu beobachten war.

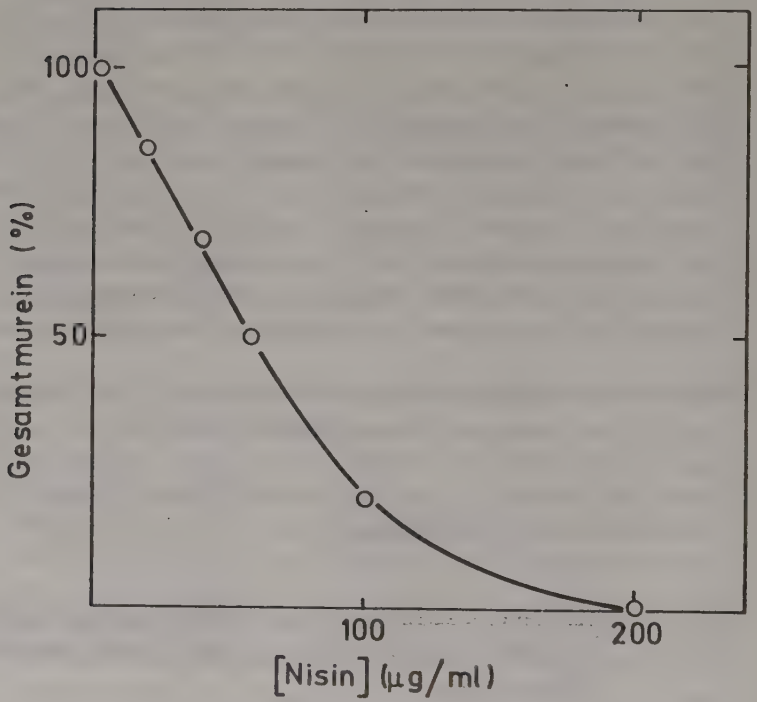


Abb.17:

Hemmung des Einbaues von MurNAc-Ala-DGlu-(^{14}C)Lys-D-Ala-DAla aus UDP-MurNAc-Ala-DGlu-(^{14}C)Lys-DAla-DAla in das Gesamtmurein durch Nisin. Als Enzym wurde der Membran-Enzymkomplex aus G. homari (94 µg Protein/6o µl) verwendet.

3.3.4.2. Bestimmung der Inhibitorkonzentrationen K_i im Lineweaver-Burk-Diagramm

Zur Ermittlung des Hemmtypes des Antibiotikums Nisin wurde sein Einfluß auf die kinetischen Parameter K_m und V_{max} für UDP-MurNAc-Ala-DGlu-(^{14}C)Lys-DAla-DAla untersucht. Die resultierenden Geraden im Lineweaver-Burk-Diagramm (Nisinkonzentrationen 0; 41,66 bzw. 58.33 µg/ml) schneiden sich in einem Punkt auf der Ordinate (Abb.18) und deshalb ist das Vorliegen eines kompetitiven Hemmtypes angezeigt. Die aus dem Diagramm entnommenen kinetischen Parameter sind in Tabelle 12 zusammengefaßt.

Der Vergleich von K_m mit K_i zeigt einen rund 10-fach höheren Wert für die Inhibitorkonstante an.

Tab.12: Zusammenstellung der kinetischen Parameter aus Abbildung 18.

Nisinkonzentration µg/ml	µmol/l	$\frac{1}{K_m}$	K_m	$\frac{1}{K_p}$	K_p	K_i	V_{max}
0	0	1,65	60	-	-	-	3.6
41.66	45.26	-	-	1.0	100.0	7.9	3.6
58.33	57.36	-	-	0.85	117.6	7.7	3.6

$\frac{1}{K_m}$ = 1/mol × 10^4 $\quad\quad$ $\frac{1}{K_p}$ = 1/mol × 10^4

K_m = µmol/l $\quad\quad$ K_p = µmol/l

K_i = µmol/l $\quad\quad$ V_{max} = pmol/min × 10^3

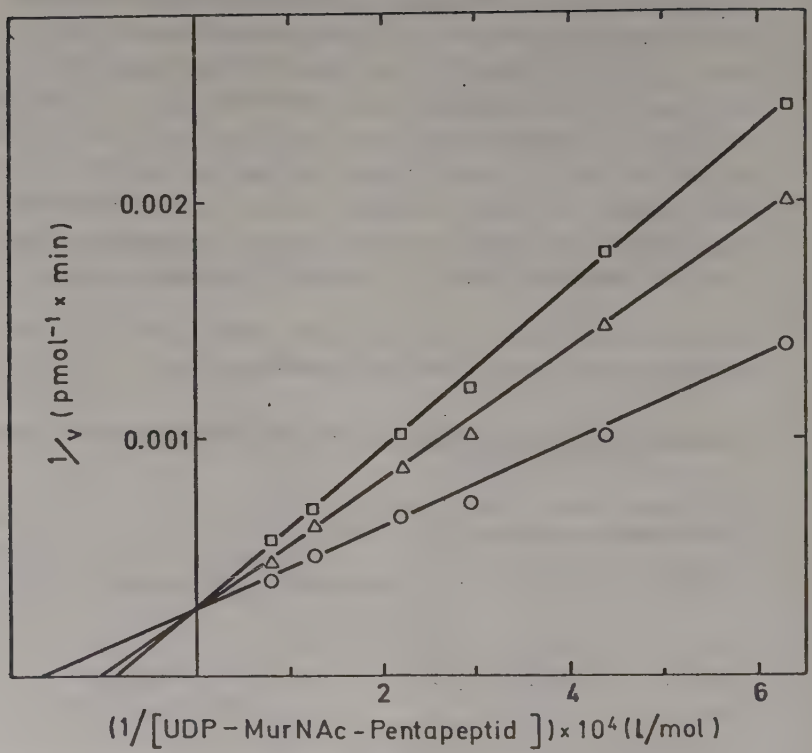


Abb.18:

Bestimmung der Inhibitorenkonzentrationen K_i im Lineweaver-Burk-Diagramm.

o——o : ohne Nisin
Δ——Δ : 41,66 µg/ml Nisin
□——□ : 58,33 µg/ml Nisin

3.3.5. Untersuchung der Phospho-MurNAc-Pentapeptid-Translokase im Membran-Enzymkomplex aus G. homari

Die Phospho-N-Acetylmuramyl-Pentapaptid Translokase (UDP-MurNAc-Ala-DGlu-Lys-DAla-DAla : Undecaprenylphosphat-phospho-MurNAc-Pentapeptid Transferase) katalysiert den ersten in der Membran ablaufenden Schritt zur Mureinbildung.

1) UDP-MurNAc-Pentapeptid + Undecaprenylphosphat $\xrightleftharpoons{K^+,\ Mg^{++}}$ Undecaprenyl-diphosphat-MurNAc-Pentapeptid + UMP

Außerdem katalysiert dieses Enzym noch folgende Austauschreaktion (Struve und Neuhaus, 1965):

2) (^{3}H)UDP-MurNAc-Pentapeptid + UMP $\xrightleftharpoons{K^+,\ Mg^{++}}$ (^{3}H)UMP + UDP-MurNAc-Pentapeptid.

Die Spezifität dieser Translokase auf Substratanaloga zu UDP-MurNAc-Ala-DGlu-Lys-DAla-DAla wurden von Hammes und Neuhaus (1974b) untersucht. Die von ihnen ausgearbeitete Versuchsdurchführung wurde zur Bestimmung der Transferase-Aktivität in dem Membran-Enzymkomplex von G. homari übernommen (Transfer assay for phospho-MurNAc-pentapeptid translocase, Hammes und Neuhaus, 1974b).

3.3.5.1. Proteinabhängigkeit der Phospho-MurNAc-Pentapeptid Translokase

Optimierungsversuche mit dem von Hammes und Neuhaus (1974b) ausgearbeiteten Reaktionsansatz ergaben bei einer Reaktionszeit von 3 min bei 25°C einen optimalen Reaktionsumsatz mit einer Enzymmenge von 235 µg Protein (Abb.19). Die Synthese-

raten verlaufen, wie auch schon Hammes und Neuhaus zeigten, bis etwa 2o sec. linear.

Mit Hilfe dieses optimierten Reaktionsansatzes konnte nun der Einfluß des Antibiotikums Nisin auf die Translokase-Aktivität untersucht werden.

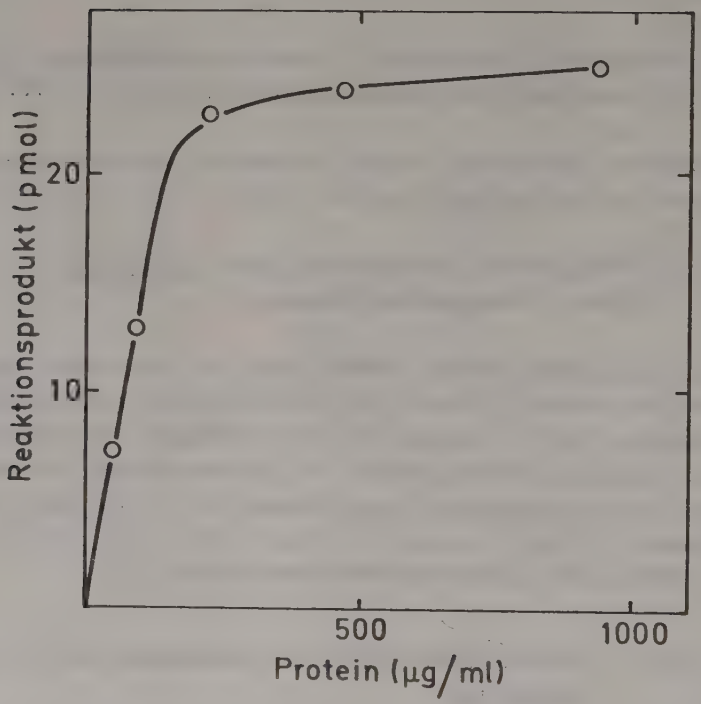


Abb.19:

Proteinabhängigkeit der Phospho-MurNAc-Pentapeptid-Translokase.Die Transferreaktion wurde mit $3,4 \times 10^{-5}$ mol UDP-MurNAc-Pentapeptid (28,8 cpm/pmol) durchgeführt.

3.3.5.2. Einfluß von Nisin auf die Translokase-Aktivität

Zur Untersuchung der Translokase-Aktivität wurde diese wie in 3.3.5.1. beschrieben in Gegenwart steigender Antibiotika-Konzentrationen bestimmt. Abbildung 2o zeigt als Ergebnis der Untersuchung einen gesteigerten Umsatz der Vorstufe UDP-MurNAc-Pentapeptid in das membrangebundene Lipid. Auch bei höchsten Antibiotika-Konzentrationen (3ooo µg/ml) tritt keine Hemmung der Enzymaktivität auf. Die Translokase, das Schlüsselenzym für die Bereitstellung der richtigen UDP-MurNAc-Pentapeptid-Vorstufe ist, wie diese Untersuchung zeigt, nicht gehemmt, sondern im Gegenteil aktiviert.

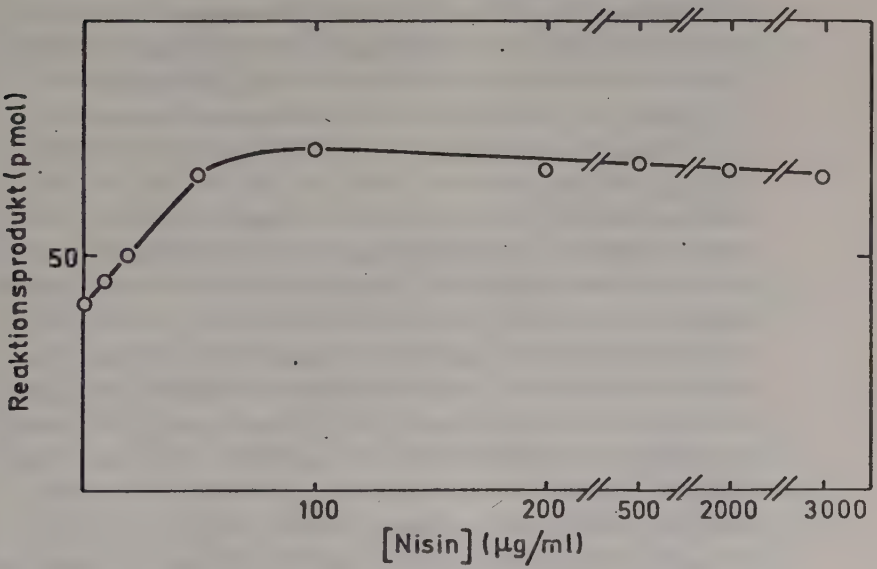


Abb. 2o:

Einfluß von Nisin auf die Translokase-Aktivität. Die Transferreaktion wurde mit $3,4 \times 10^{-5}$ mol UDP-MurNAc-Pentapeptid (28,8 cpm/pmol) durchgeführt.

4. Diskussion

Die Peptiduntereinheit der Mureinvorstufe UDP-MurNAc-Pentapeptid wird während der *in vitro* Synthese des zellwandgebundenen Mureins durch die Aktivitäten von DD- und LD-Carboxypeptidasen teilweise zu Tetrapeptid und Tripeptid abgebaut. Es muß angenommen werden, daß diese Reaktion auch unter *in vivo* Bedingungen abläuft, denn die Analyse des Mureins von *Gaffkya homari* hat gezeigt, daß die D-Alaninreste in Position 4 und 5 teilweise fehlen (Nakel et al. 1971). Die Aktivität der LD-Carboxypeptidase weist in überraschender Weise eine bisher einzigartige Substratspezifität auf. Während das Enzym aus *Escherichia coli* die UDP-aktivierten Vorstufen, sowie ähnliche lösliche Substrate abbaut (Izaki, Strominger, 1968), wird UDP-MurNAc-Tetrapeptid durch das Enzym aus *G. homari* nicht gespalten. Darüberhinaus haben diese Untersuchungen ergeben, daß das wandgebundene Murein weder von DD- noch von LD-Carboxypeptidasen aus *G. homari* als Substrat verwendet wird. Auch das lösliche Murein erwies sich als ein sehr schlechtes Substrat. Deshalb muß angenommen werden, daß das Murein in *statu nascendi* das eigentliche Substrat für die Carboxypeptidasen darstellt. Diese Zwischenstufe ist nicht das lösliche Murein, sondern ist die wachsende Mureinkette, die

am nicht reduzierenden Ende fortlaufend quervernetzt wird, während es gleichzeitig am lipidaktivierten, reduzierenden Ende durch Transglukosidierung verlängert wird (Oldmixon et al., 1976; Fuchs-Cleveland and Gilvarg, 1976). Die Peptiduntereinheiten werden zuerst von der DD-Carboxypeptidase zu Tetrapeptiduntereinheiten verkürzt, wodurch die Substrate für die LD-Carboxypaptidase entstehen. Die LD-Carboxypeptidase muß somit einige Peptiduntereinheiten danach am wachsenden Mureinstrang angreifen.

Die DD-Carboxypeptidase spaltet D-Alanin auch von der UDP-aktivierten Vorstufe ab, zeigt aber in Gegenwart von UDP-N-acetylglucosamin, also unter Bedingungen, die eine Mureinsynthese zulassen, eine 4.5-fache Steigerung ihrer Aktivität. Diese Steigerung kann aber nicht auf die D-Alaninabspaltung durch die Transpeptidase zurückgeführt werden; denn wie von Hammes (1976) gezeigt wurde, spaltet die Transpeptidase unter den verwendeten Versuchsbedingungen kein D-Alanin von der neu eingebauten Peptiduntereinheit ab.

Die Tatsache, daß die Aktivität einer Carboxypeptidase nicht oder nur zum Teil mit UDP-aktivierten Vorstufen allein bestimmt werden kann, erlaubt auch eine erneute Diskussion darüber, welche Rolle diese Enzyme bei anderen Organismen während der Mureinsynthese haben. Bei einigen Organismen wurde nämlich beobachtet, daß sich die Aktivität der DD-Carboxypeptidase, die durch Abspaltung von D-Alanin aus UDP-MurNAc-Pentapeptid oder ähnlichen, löslichen Substraten bestimmt worden war, mit Penicillin G vollständig hemmen ließ. Die Quervernetzung des Mureins wurde dadurch aber nicht beeinflußt. Umgekehrt ließ sich die Quervernetzung des Mureins hemmen, ohne daß dabei die Aktivität der DD-Carboxypeptidase

beeinträchtigt wurde (Blumberg und Strominger, 1971; 1974). Aus diesem Grunde erschien der Schluß verständlich, daß die DD-Carboxypeptidase nicht der "killing site" für Penicillin darstellt und daß dieses Enzym für die Synthese eines quervernetzten Mureins nicht notwendig ist. Hier kann aber nicht ausgeschlossen werden, daß noch eine weitere DD-Carboxypaptidase existiert, die eine Affinität zum naszierenden Murein hat, eine andere Empfindlichkeit gegenüber Penicillin aufweist und deren Aktivität mit dem löslichen Substrat nicht erfaßt werden kann. Die Rolle dieser hypothetischen Carboxypeptidase entspräche dann derjenigen in G. homari. In diesem Bakterium findet aber der Einbau von naszierendem Murein durch Transpeptidierung nur statt, wenn es Tetrapeptiduntereinheiten enthält, die wiederum durch die Aktivität der DD-Carboxypeptidase entstanden sind (Hammes, 1976).

Offenbar spielt aber auch der Gehalt an Tripeptiduntereinheiten am naszierenden Murein eine entscheidende Rolle für die Aktivität der Transpeptidase. Wie die Untersuchungen gezeigt haben, wird diese Bildung von Tripeptiduntereinheiten durch hohe Konzentrationen von Penicillin G gehemmt. Andererseits wurde mit Cephalosporin C beobachtet, daß in Gegenwart hoher Antibiotikakonzentrationen die Alaninabspaltung verstärkt stattfindet. Diese Aktivierung findet bei jenen Konzentrationen statt, bei denen auch die Transpeptidase gehemmt ist.

Eine naheliegende Interpretation dieses Effektes besteht darin, daß unter dem Einfluß des Antibiotikums mehr Tripeptiduntereinheiten gebildet werden und daß der erhöhte

Gehalt an diesen Untereinheiten eine Verringerung der Affinität der Transpeptidase zum naszierenden Murein bewirkt.

Im Verlauf des Abfassens dieser Arbeit wurden von Hammes diese Untersuchungen weitergeführt und Ergebnisse erhalten, die eine andere Interpretation jedoch wahrscheinlicher machen. Die Hemmwirkung der D-Aminosäuren auf die Synthese von wandgebundenem Murein ist nämlich direkt mit dem Hemmeffekt von Cephalosporin C vergleichbar. So besitzt das Antibiotikum eine D-Aminosäure (D-α-aminoadipinsäure) mit einer freien Carboxyl-, und Aminogruppe am assymetrischen C-Atom. Außerdem stimmt der für Cephalosporin C gefundene ID_{50}-Wert (1,2 mmol/l) mit den für D-Aminosäuren bestimmten ID_{50}-Werten in etwa über ein (ID_{50}-Wert für D-Leucin = 1,3 mmol/l).

Ähnlich wie bei der von Hammes bereits gezeigten Hemmung der Mureinsynthese durch D-Aminosäuren, könnte hier unter Mureinsynthesebedingungen Cephalosporin C in einer von der LD-Carboxypeptidase katalysierten Austauschreaktion anstelle von D-Alanin eingebaut werden. Als Produkt wird deshalb vermehrt freies D-Alanin aus Position 4 der Peptiduntereinheit gefunden. Die mit dem Antibiotikum verknüpfte Peptiduntereinheit wird anschließend von der Transpeptidase nicht mehr als Substrat verwendet, so daß eine Hemmung der Synthese des wandgebundenen Mureins erfolgt.

Cephalosporin C hemmt aber auch die Synthese des wandgebundenen Mureins aus UDP-MurNAc-Pentapeptid, was mit der beobachteten Hemmung der DD-Carboxypeptidase übereinstimmt. Im Unterschied zum Hemmeffekt mit

Cephalosporin C zeigt sich bei Penicillin G als Inhibitor eine gleichzeitige Hemmung der Abspaltung von D-Alanin aus Position 4 der Peptiduntereinheit. Das zeigt einen unterschiedlichen Wirkmechanismus der beiden ß-Laktamringantibiotika an. Bei niedrigen Konzentrationen hemmt Penicillin G wie Cephalosporin C die DD-Carboxypeptidaseaktivität, so daß im naszierenden Murein nicht genügend Tetrapeptidunter-einheiten geschaffen werden können.

Bei hohen Konzentrationen kann der Hemmechanismus von Penicillin G wieder analog der von Hammes diskutierten Wirkung von D-Aminosäuren interpretiert werden. Durch eine direkte Hemmung der LD-Carboxypeptidase wird weniger D-Alanin aus Position 4 der Peptiduntereinheit abgespalten. Dieses neue Substrat kann daraufhin von der Transpeptidase nicht weiter eingebaut werden, so daß eine Hemmung der Synthese des wandgebundenen Mureins auftritt. Bei G. homari spielen die Carboxypeptidasen eine Schlüsselrolle. Nur Murein in statu naszendi, das eine spezifische Zusammensetzung aus Tetra- und Tri-peptiduntereinheiten enthält, kann quervernetzt werden. Wird das durch die Wirkung der ß-Laktamringantibiotika verhindert, so unterbleibt die Quervernetzung.

Die strukturähnlichen Peptidantibiotika Nisin und Subtilin hemmen die Mureinsynthese auf einer früheren Stufe als die ß-Laktamringantibiotika. Wie bereits von Linnett und Strominger (1973) gezeigt wurde, findet in ihrer Gegenwart die Polymerisierung der lipidaktivierten Vorstufen zu Glycansträngen nicht mehr statt. Bei Verwendung von Subtilin wurde diese Hemmung von einer Anreicherung eines Lipidzwischenproduktes begleitet.

Diese Anreicherung fehlte andererseits bei Verwendung von Nisin. In jenen Untersuchungen wurde die Mureinsynthese durch Messen des Einbaues von radioaktiv markierten N-Acetylglucosamin aus der UDP-aktivierten Vorstufe bestimmt. Bei Verwendung dieses radioaktiven Substrates wurden von uns identische Ergebnisse erzielt. Wir erhielten aber andere Ergebnisse, wenn die Mureinsynthese durch Messen des Einbaues von radioaktiv markierten MurNAc-Peptiden aus der UDP-aktivierten Mureinvorstufe bestimmt wurde. Aus den Untersuchungen von Linnett und Strominger (1973) kann geschlossen werden, daß mit Nisin entweder eine Hemmung der Phospho-N-acetylmuramylpentapeptid Transferase (UMP) oder der N-acetylglucosamin Transferase (UDP) und mit Subtilin eine Hemmung der Peptidoglycan Synthetase vorliegt. Unsere Untersuchungen lassen dagegen erkennen, daß mit Nisin die N-Acetylglucosamin Transferase, d.h. der Einbau von N-Acetylglucosamin gehemmt ist. Die Ursache für diese Hemmung ist wahrscheinlich eine Komplexbildung zwischen Antibiotikum und der lipidaktivierten Mureinvorstufe. Dafür sprechen 3 Beobachtungen:

1) In Gegenwart von Nisin ist die Phospho-MurNAc-Pentapeptid Transferreaktion aktiviert und C_{55}-P-P-MurNAc-(^{14}C)peptid wird angereichert.

2) Es liegt eine kompetitive Hemmung vor, die bei einer Komplexbildung der Lipidzwischenstufe mit Nisin erwartet werden muß.

3) Die mit Detergens gewaschenen Zellwände können in Gegenwart von Nisin die Vorstufe binden, wobei diese Bindung sogar konzentrationsabhängig ist.

Eine Komplexbildung in Analogie zu Vancomycin (Hammes und Neuhaus, 1974c) konnte nicht festgestellt werden, denn es zeigte sich mit Nisin, daß im Unterschied zu Vancomycin, die Hemmung der Mureinsynthese unabhängig von der Gegenwart der C-terminalen D-Alanyl-D-Alanin-sequenz war; sie trat auch mit UDP-MurNAc-Tetrapeptid und UDP-MurNAc-Tripeptid auf. Zusätzlich sollte auch eine freie ε-Aminogruppe nicht zur Komplexbildung beitragen, weil diese auch bei Verwendung von acetyliertem UDP-MurNAc-Peptid als Substrat der Mureinsynthese gefunden wurde.

Man muß annehmen, daß hier ein tertiärer Komplex von Murein, Antibiotikum und Lipidvorstufe vorliegt. Allerdings konnte die Beteiligung des Antibiotikums am Komplex nicht nachgewiesen werden, wegen des Fehlens von radioaktivem Nisin.

Ausgehend von diesen Befunden wurden die Untersuchungen von Reisinger und Hammes fortgesetzt und es gelang den von mir vermuteten Komplex aus den Komponenten Nisin und isoliertem Lipid ohne Enzym herzustellen und zu isolieren (Reisinger und Hammes, 1979). Als Wirkungsort von Nisin kann also die Komplexierung des Antibiotikums mit Undecaprenylpyrophospho-MurNAc-Peptid angesehen werden. Nisin zeigte aber auch die Eigenschaft, mit der in der Biosynthese nachfolgenden Mureinzwischenstufe Undecaprenylpyrophospho-MurNAc-(peptid)-GlcNAc einen Komplex zu bilden. Mit beiden Nisin-Lipidkomplexen kann also keine Glycanstrangsynthese mehr erfolgen und deshalb reichern sie sich in den Membranen als Komplexe mit dem Antibiotikum an.

Die Hemmwirkung des in der Struktur ähnlichen Antibiotikums Subtilin beruht auch auf einer Komplexbildung (Manuskript in Vorbereitung), die aber bevorzugt mit dem GlcNAc-enthaltenden Lipid auftritt. Die in meinen Versuchen auftretenden Lipid-aktivierten Vorstufen konnten aufgrund des ähnlichen papierchromatographischen Verhaltens im verwendeten Laufmittel A von mir nicht von dem Antibiotikum-Lipidkomplex getrennt werden, so daß in dieser vorliegenden Arbeit der Nachweis des Komplexes mit Subtilin nicht möglich war.

5. Zusammenfassung

Die Aktivitäten der DD- und LD-Carboxypeptidase wurden während der *in vitro* Mureinsynthese aus verschiedenen UDP-MurNAc-Peptidvorstufen mit Hilfe des Zellwand-Membran-Enzymkomplexes aus *Gaffkya homari* untersucht. Die Peptiduntereinheit wird von den beiden Aktivitäten derart hydrolysiert, daß, wie es auch *in vivo* feststellbar ist, im synthetisierten Polymer Pentapeptide, Tetrapeptide und Tripeptide gefunden werden. Die LD-Carboxypeptidase spaltet kein D-Alanin aus UDP-MurNAc-Tetrapeptid ab - ihr Substrat sind Tetrapeptiduntereinheiten im naszierenden Murein. Die DD-Carboxypeptidase spaltet aber D-Alanin aus der UDP-aktivierten Vorstufe MurNAc-Pentapeptid ab, allerdings ist ihre Aktivität am naszierenden Murein viermal so groß.

Die *in vitro* Mureinsynthese war bei niederen Konzentrationen an Penicillin G (ID_{50} = 1,5 µmol/l) gehemmt. Die Hemmung beruht auf einem primären Effekt des Antibiotikums auf die DD-Carboxypeptidase. Bei hohen Penicillinkonzentrationen wird zusätzlich auch noch die LD-Carboxypeptidase gehemmt (ID_{50} = 3,1 mmol/l). Cephalosporin C

hemmt ebenfalls im niederen Konzentrationsbereich (ID_{50} = 0.29 mmol/l) die DD-Carboxypeptidase. Im höheren Bereich (ID_{50} = 1.3 mmol/l) tritt dagegen eine vermehrte Freisetzung von D-Alanin aus Position 4 der Peptiduntereinheit auf. Beide ß-Laktamringantibiotika haben also bei Anwendung hoher Konzentrationen einen Effekt auf die LD-Carboxypeptidase.

Der Wirkungsmechanismus der Peptidantibiotika Nisin und Subtilin wurde untersucht. Die Ergebnisse legen eine Komplexbildung aus den Antibiotika mit einem Undecaprenylpyrophospho-aktivierten Zwischenprodukt nahe. Dabei zeigt Nisin die Eigenschaft, daß es mit C_{55}-P-P-MurNAc-Peptid sowie mit der in der Biosynthese nachfolgenden Lipidzwischenstufe (C_{55}-P-P-MurNAc-(peptid)-GlcNAc) einen Komplex bildet. Subtilin dagegen scheint mit der GlcNAc-enthaltenden Lipidzwischenstufe zu komplexieren.

6. Literaturverzeichnis

Anderson, J.S., M.Matsuhashi, M.A. Haskin, and J.L.Strominger (1965). Lipidphosphodisaccharide-pentapeptide: A presumed membrane transport intermediate in the biosynthesis of bacterial cell walls. Proc.Natl.Acad.Sci. U.S. 53, 881-889.

Anderson, J.S., M.Matsuhashi, M.A.Haskin, and J.L.Strominger (1967). Biosynthesis of the peptidoglycan of bacterial cell walls: II. phospholipid carriers in the reaction sequence. J.Biol.Chem. 242, 3180-3190.

Beck, B.D. and J.T.Park (1977). Basis for the observed fluctation of carboxypeptidase II activity during the cell cycle in BUG 6, a temperature sensitive division mutant of Escherichia coli. J.Bacteriol. 130, 1292-1302.

Blumberg, P.M. and J.L.Strominger (1971). Inactivation of D-Alanine carboxypeptidase by penicillins and cephalosporins is not lethal in Bacillus subtilis. Proc.Nat.Acad.Sci.USA 68, 2814-2817.

Blumberg, P.M. and J.L.Strominger (1974). Interaction of penicillin with the bacterial cell: penicillin-binding proteins and penicillin-sensitive enzymes. Bacteriol. Rev. 38, 291-335.

Dawson, R.M.C., D.C.Elliott, W.H.Elliott and K.M.Jones (1969). Data for biochemical research. Oxford University Press,New York and Oxford.

Dixon, M. and E.C.Webb (1971). Enzyme inhibitors, p. 315-359. In M. Dixon and E.C.Webb (ed.), Enzymes. Longman Group Limited, London.

Dusart, J., A.M.J.M.Ghuysen,J.M.Frere, R.Moreno, M.Leyh-Bouille, K.Johnson, C.Lucchi, H.R.Perkins, and M.Nieto (1973). DD-Carboxypeptidase-transpeptidase and killing site of ß-lactam antibiotics in streptomyces strains R 39, R 61, and K 11. Antimicrob. Agents Chemother. 3, 181-187.

Fuchs-Cleveland, E. and C.Gilvarg (1976). Oligomeric intermediate in peptidoglycan biosynthesis in Bacillus megaterium. Proc.Natl.Acad.Sci. USA 11, 42oo-42o4.

Hammes, W.P., and Neuhaus, F.C. (1973). Abstracts of the annual meeting of the American Society for Microbiology, Miami Beach, May, 6-11, p.76.

Hammes, W.P., and Neuhaus, F.C. (1974a). On the specificity of phospho-N-acetylmuramylpentapeptide translocase. J.Biol.Chem. 249, 314o-315o.

Hammes, W.P., and F.C.Neuhaus (1974b). Biosynthesis of peptidoglycan in Gaffkya homari: role of the peptide subunit of uridine diphosphate-N-acetyl-muramyl-pentapeptide, J.Bacteriol. 12o, 21o-218.

Hammes, W.P., and F.C.Neuhaus (1974c). On the mechanism of action of vancomycin: inhibition of peptidoglycan synthesis in Gaffkya homari. Antimicrob. Agents Chemother. 6, 722-728.

Hammes, W.P. (1976). Biosynthesis of peptidoglycan in Gaffkya homari: the mode of action of penicillin G and mecillinam. Eur.J.Biochem. 7o, 1o7-113.

Hammes, W.P., and O.Kandler (1976). Biosynthesis of peptidoglycan in Gaffkya homari: the incorporation of peptidoglycan into the cell wall and the direction of transpeptidation.Eur.J.Biochem. 7o, 97-1o6.

Hammes, W.P., R.Neukam and O.Kandler (1977). On the specifity of the uridine diphospho-N-acetylmuramylalanyl-D-glutamic acid: diamino acid ligase of Bifidobacterium globosum. Arch. Microbiol. 115, 95-1o2.

Hammes, W.P. und H.Seidel (1978). The activities in vitro of DD-Carboxypeptidase and LD-Carboxypeptidase of Gaffkya homari during biosynthesis of peptidoglycan. Eur.J.Biochem. 84, 141-147.

Heydanek, M.G., Linzer, R., Pless, D.D. and Neuhaus, F.C. (197o). Initial stage in peptidoglycan synthesis. Biochem.9, 3618-3623.

Izaki, K. and J.L.Strominger (1968). Biosynthesis of the peptidoglycan of the bacterial cell walls. XIV. Purification and properties of two carboxypeptidases from Escherichia coli. J.Biol.Chem. 243, 3193-32o1.

Leyh-Bouille, M., M.Nakel, J.M.Frere, K.Johnson, J.M. Ghuysen, M.Nieto, and H.R.Perkins (1972). Penicillin-sensitive DD-carboxypeptidases from Streptomyces strains R 39 and K 11. Biochem. 11, 129o-1298.

Linnett, P.E., and Strominger, J.L. (1973). Additional antibiotic inhibitors of peptidoglycan synthesis. Antimicrobial Agents Chemother. 4, 231-236.

Lowry, O.H., N.J.Rosebrough, A.L.Farr and R.J.Randall (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. J.Biol.Chem. 193, 265-275.

Merrifield, R.B. (1963). Solid phase peptid synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. J.Am.Chem.Soc. 85, 2149-2154.

Merrifield, R.B. (1964). Solid phase peptide synthesis. III. An improved synthesis of bradykinin. Biochem.3, 1385-139o.

Merrifield, R.B., and M.A.Corrigliano (1968). Glycyl-L-aspartyl-L-seryl-glycine. Biochem.Prep. 12-98-1o3.

Merrifield, R.B. (1969). Solid phase peptide synthesis. Adv.Enzymol. 32, 221-296.

Nakel, M., J.-M.Ghuysen, and O.Kandler (1971). Wall peptidoglycan in Aerococcus viridans strains 2o1 Evans and ATCC 11563 and in Gaffkya homari strain ATCC 1o4oo. Biochem. 1o, 217o-2175.

Neuhaus, F.C. and W.G.Struve (1965). Enzymatic synthesis of analogs of the cell-wall precursor. I. Kinetics and specificity of uridine diphospho-N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-glutamyl-L-lysin: D-alanyl-D-alanine ligase (adenosine diphosphate) from Streptococcus faecalis R. Biochemistry 4, 12o-131.

Nieto, M. and H.R.Perkins (1971). Modefications of the acyl-D-alanyl-D-alanin terminus affecting complex-formation with vancomycin. Biochem.J.123, 789-8o3.

Nieto, M., Perkins, H.R., Leyh-Bouille, M., Frere, J.M. and Ghuysen, J.M. (1973). Peptide inhibitors of Streptomyces DD-Carboxypeptidases. Biochem.J. 131, 163-171.

Oldmixon, E.H., Dezelee, P-, Ziskin, M.C. and Shockman, G. (1976). Monomer addition as a mechanism of forming peptide cross-links in the cell-wall peptidoglycan Streptococcus faecalis ATCC 979o. Eur.J.Biochem. 68, 271-28o.

Patterson, M.S. and R.C.Greene (1965). Measurement of low energy beta-emitters in aqueous solution by liquid scintillation counting of emulsions. Anal.Chem. 37, 854-857.

Reisinger, O.W.M., H.Seidel, W.P.Hammes (1979). Tagung der Sektion I der DGHM (Abwassermikrobiologie) und der Deutschen Sektion der ASM (Molekulare Systematik) München, S.8o.

Salton, M.R.J. (1964). The Bacterial Cell Wall. Amsterdam: Elsevier Publ. Co. p. 107.

Schleifer, K.H. und R.M.Krause (1971). The immunochemistry of peptidoglycan. The immunodominant site of the peptid subunit and the contribution of each of the amino acids to the binding properties of the peptides. J.Biol.Chem. 246, 986-993.

Schleifer, K.H. and O.Kandler (1972). Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. Bacteriol. Rev. 36, 407-477.

Schwyzer, R., P. Sieber, und H. Kappeler (1959). Zur Synthese von N-t-Butyloxycarbonylaminosäuren. Helv.Chim. Acta 42, 2622-2624.

Stewart, J.M., and Young, J.D. (1969). Solid phase peptid synthesis. W.H. Freeman and Company, San Francisco.

Struve, W.G., and F.C.Neuhaus (1965). Evidence for an initial acceptor of UDP-NAc-muramyl-pentapeptide in the synthesis of bacterial mucopeptide. Biochem.Biophys.Res.Commun. 18, 6-12.

Ward, J.B., and H.R.Perkins (1973). The direction of glycan synthesis in a bacterial peptidoglycan. Biochem.J. 135, 721-728.

Ward, J.B. and H.R. Perkins (1974). Peptidoglycan biosynthesis by preparations from Bacillus licheniformis: cross-linking of newly synthesized chains to preformed cell wall. Biochem.J. 139, 781-784.

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Allgemeine Botanik der Ludwig-Maximilians-Universität München unter Dr. W.P. Hammes von September 1974 bis September 1977 angefertigt.

Ganz besonders möchte ich Herrn Dr. W.P. Hammes für alle persönlichen Anregungen, wertvolle Diskussionen und seine stete Anteilnahme an meiner Arbeit danken.

Mein Dank gilt auch den kollegialen Mitarbeitern am Botanischen Institut.

Frau G. Tussing danke ich für ihre sorgfältige Assistenz.

Lebenslauf

Am 2.5.1947 wurde ich, Heinz Seidel, als Sohn des Installateurs Alfred Seidel und seiner Ehefrau Irmgard, geb. Müller, in Kaisheim Kreis Donauwörth geboren.

Von 1953 bis 1958 besuchte ich die Volksschule in Gilching-Argelsried und anschließend das Max-Planck-Gymnasium in München-Pasing. Dort legte ich am 23.7.1968 die Reifeprüfung ab.

Danach begann ich mit der Ausbildung als Apothekerpraktikant in der Prielmayer-Apotheke in München. Im September 1970 bestand ich die pharmazeutische Vorprüfung.

Vom Sommersemester 1971 an studierte ich Pharmazie an der Ludwig-Maximilians-Universität München, wo ich im Frühjahr 1974 das pharmazeutische Staatsexamen bestand. Meine Approbation als Apotheker erhielt ich im August 1976.

Im September 1974 begann ich unter Anleitung von Dr.W.P.Hammes mit der Ausarbeitung der vorliegenden Arbeit.

Während dieser Zeit bekam ich ein Stipendium nach dem Graduiertenförderungsgesetz.

Seit dem 30.7.1975 bin ich mit der Beschäftigungstherapeutin Eira Väisänen-Seidel geb. Väisänen verheiratet und habe eine Tochter.

Am 3.1.1978 übernahm ich die Leitung der St. Leonhard-Apotheke in 8949 Kirchheim.